# β-Glucansynthese in zellfreien Systemen: Charakterisierung, Isolierung und Reinigung beteiligter Enzyme aus Suspensionskulturen von Daucus carota L.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

**Edgar Ingold**
aus Freiburg

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546523_0012

# β-Glucansynthese in zellfreien Systemen: Charakterisierung, Isolierung und Reinigung beteiligter Enzyme aus Suspensionskulturen von Daucus carota L.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

**Edgar Ingold**
aus Freiburg

1985

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 23. August 1985 |
| Dekan: | Prof. Dr. H.U. Seitz |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. H.U. Seitz |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. A. Hager |

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| II. | MATERIAL UND METHODEN | 13 |
| 1. | Versuchsobjekte | 13 |
| 1.1. | Daucus carota | 13 |
| 1.2. | Weitere Objekte | 13 |
| 2. | Parameter zur Charakterisierung der Kultur | 13 |
| 2.1. | Frischgewicht | 13 |
| 2.2. | Trockengewicht | 14 |
| 2.3. | pH des Kulturmediums | 14 |
| 3. | Aufarbeitung der Zellen zur Isolierung der Glucosyltransferasen | 14 |
| 3.1. | Homogenisierung | 14 |
| 3.1.1. | Gefrorenes Zellmaterial | 14 |
| 3.1.2. | Frisches Zellmaterial | 14 |
| 3.2. | Aufarbeitung des Rohhomogenats durch Zentrifugation | 15 |
| 3.2.1. | Differentielle Zentrifugation | 15 |
| 3.2.2. | Membrantrennung über lineare Dichtegradienten | 15 |
| 4. | Charakterisierung der Gradientenfraktionen mit Hilfe von Leitenzymen | 15 |
| 5. | Isolierung einer löslichen Glucosyltransferase | 16 |
| 5.1. | Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung | 16 |
| 5.2. | Entsalzung mit Sephadex G-25 | 16 |
| 5.3. | Trennung über Sephadex G-75 | 17 |
| 5.4. | Trennung über AcA 34 | 17 |
| 6. | Lyophilisierung von Enzymproben | 17 |
| 7. | Solubilisierung der Glucosyltransferasen | 17 |
| 7.1. | Solubilisierung durch Behandlung mit Salzen | 17 |
| 7.2. | Solubilisierung durch Behandlung mit Detergentien | 18 |
| 8. | Das Glucosyltransferase-Testsystem | 18 |
| 8.1. | Vorbemerkung | 18 |

| | | |
|---|---|---|
| 8.2. | Vorstellung des Testsystems | 19 |
| 8.2.1. | Testansatz nach RAY (1979) zur Messung der Glucansynthetasen | 19 |
| 8.2.2. | Modifizierte Testansätze zur Messung der Glucosyltransferasen | 20 |
| 8.2.3. | Mannosyltransferase-Test | 20 |
| 8.3. | Messung der Glucosyl- und Mannosyltransferase-Aktivität | 21 |
| 8.3.1. | Durchführung des Tests | 21 |
| 8.3.2. | Aufbereitung der Produkte | 22 |
| 8.3.3. | Abstoppen des Tests über Sephadex G-75 | 23 |
| 8.3.4. | Abstoppen des Tests über PC | 23 |
| 9. | Charakterisierung der Glucosyltransferasen in vitro | 23 |
| 9.1. | Bestimmung des pH-Optimums | 23 |
| 9.2. | Einfluß der Substratkonzentration | 24 |
| 9.3. | Einfluß von Effektoren | 24 |
| 10. | Charakterisierung der in vitro-Produkte | 25 |
| 10.1. | Löslichkeit | 25 |
| 10.2. | Stabilität | 26 |
| 10.2.1. | Säurestabilität | 26 |
| 10.2.2. | Stabilität in Alkali | 27 |
| 10.2.2.1. | Milde Alkali-Behandlung | 27 |
| 10.2.2.2. | Starke Alkali-Behandlung (hohe Konzentration) | 27 |
| 10.3. | Bindungsanalysen | 27 |
| 10.3.1. | Enzymatische Produktanalyse | 27 |
| 10.3.1.1. | Behandlung der Produkte mit abbauenden Enzymen | 28 |
| 10.3.1.2. | Test der hydrolytischen Enzyme auf ihre Spezifität | 28 |
| 10.4. | Papierchromatographie | 28 |
| 10.5. | Methylierungsanalyse | 30 |
| 10.6. | Gelfiltration | 30 |
| 11. | In vivo-Versuche | 31 |
| 12. | Proteinbestimmung | 31 |
| 13. | Kulturmedium, Puffer und Lösungen | 31 |

| | | |
|---|---|---|
| 13.1. | Kulturmedium | 31 |
| 13.2. | Puffer und Lösungen | 32 |
| 14. | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 34 |
| 14.1. | Chemikalien | 34 |
| 14.2. | Verbrauchsmaterial | 36 |
| 15. | Abkürzungen | 36 |
| III. | ERGEBNISSE | 38 |
| 1. | Glucosyltransferasen in suspensionskultivierten Zellen | 38 |
| 1.1. | Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten verschiedener Kulturen | 38 |
| 1.2. | Kulturalterabhängigkeit der Glucosyltransferasen in Suspensionskulturen von Daucus carota | 40 |
| 1.2.1. | Wachstumsverhalten der Kultur | 40 |
| 1.2.2. | Glucosyltransferasen im Verlauf der Kultivierung | 42 |
| 2. | Isolierung der Glucosyltransferasen | 44 |
| 2.1. | Differentielle Zentrifugation | 44 |
| 2.2. | Lineare Gradienten | 46 |
| 2.2.1. | Glucosyltransferasen | 46 |
| 2.2.2. | Leitenzyme | 50 |
| 2.2.3. | Anreicherung der Glucosyltransferasen | 51 |
| 2.3. | Orientierung der Membranen nach der Homogenisation | 52 |
| 3. | Charakterisierung der Glucosyltransferasen | 54 |
| 3.1. | Temperaturabhängigkeit | 55 |
| 3.2. | Abhängigkeit vom pH | 56 |
| 3.3. | Zeitabhängigkeit | 57 |
| 3.4. | Proteinabhängigkeit | 58 |
| 3.5. | Gefriertrocknung der Enzyme | 59 |
| 3.6. | Einfluß von Ionen auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten | 59 |
| 3.6.1. | Konzentrationsabhängigkeit von verschiedenen Salzen | 60 |
| 3.6.2. | Einfluß kombinierter Salzmischungen auf die Enzymaktivitäten | 63 |
| 3.6.3. | Einfluß von EDTA und EGTA auf die Enzymaktivitäten | 64 |

| | | |
|---|---|---|
| 3.7. | Einfluß von Cellobiose auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten | 66 |
| 3.8. | Einfluß der Substratkonzentration | 67 |
| 3.8.1. | GT IIU | 67 |
| 3.8.2. | GT IU und GT IG | 68 |
| 3.8.3. | GT IsU | 70 |
| 3.8.4. | Substratabhängigkeit der Glucosyltransferasen bei verschiedenen Testbedingungen | 71 |
| 3.8.5. | Substratabhängigkeit von GT IU und GT IG unter Einfluß von GDPG bzw. UDPG | 73 |
| 3.9. | Einfluß von Nukleotiden | 76 |
| 3.10. | Einfluß von Nukleotid-Zucker | 79 |
| 3.11. | Einfluß von "Inhibitoren" der Glucansynthese und anderen Effektoren | 82 |
| 3.11.1. | Inhibitoren der Cellulosesynthese | 82 |
| 3.11.2. | Inhibitoren der ß-1,3-Glucan-Synthese | 83 |
| 3.11.3. | Calcofluor white | 85 |
| 3.11.4. | Andere Effektoren | 86 |
| 4. | Charakterisierung der Produkte der Glucosyltransferasen | 88 |
| 4.1. | Löslichkeitseigenschaften | 88 |
| 4.2. | Stabilität der Produkte | 89 |
| 4.2.1. | Säurestabilität | 89 |
| 4.2.2. | Stabilität in Alkali | 90 |
| 4.3. | Bindungsanalysen | 90 |
| 4.3.1. | Enzymatische Produktanalyse | 90 |
| 4.3.1.1. | Spezifität der Glucanasen | 90 |
| 4.3.1.2. | Abbau der Produkte durch hydrolytische Enzyme | 92 |
| 4.3.1.3. | Papierchromatographie der Hydrolysefragmente | 93 |
| 4.3.2. | Methylierungsanalyse | 97 |
| 4.4. | Größe der Produkte | 100 |
| 5. | Solubilisierung der Glucosyltransferasen | 102 |
| 5.1. | Vorversuche | 102 |
| 5.2. | Waschung der Membranen mit Salzlösung | 104 |

| | | |
|---|---|---|
| 5.3. | Behandlung der Membranen mit Digitonin | 105 |
| 5.3.1. | Auswirkungen auf die Glucosyltransferase-Aktivität | 105 |
| 5.3.2. | Solubilisierung der Glucosyltransferasen | 107 |
| 5.4. | Trennung der solubilisierten Enzyme über Molekularsiebe | 108 |
| 5.5. | Charakterisierung der Enzymprodukte | 109 |
| 6. | Die lösliche Glucosyltransferase GT IsU | 112 |
| 6.1. | Ammoniumsulfat-Fällung | 113 |
| 6.2. | Zeitabhängigkeit bei verschiedenen Testbedingungen | 114 |
| 6.3. | ß-Eliminierung | 115 |
| 6.4. | Protease-Labilität | 117 |
| 6.5. | Größe von Enzym und Produkt | 119 |
| 6.6. | Reinigung der GT IsU | 122 |
| 6.7. | Zeitabhängigkeit: Einfluß von Nukleotid-Zucker | 123 |
| 7. | Die Rolle von GDP-Mannose bei der Glucosyltransferase I | 124 |
| 7.1. | Zeitabhängigkeit des Zuckereinbaus unter GT I-Test-bedingungen | 124 |
| 7.1.1. | Einfluß verschiedener Zucker-Nukleotide auf die GT IG-Aktivität | 124 |
| 7.1.2. | GDP-Mannose-Einfluß bei Verwendung von gereinigten Enzymfraktionen | 125 |
| 7.1.3. | Zeitabhängigkeit mit solubilisierten Enzymen | 128 |
| 7.1.4. | Zeitabhängigkeit der GT IG nach Vorinkubation mit GDP-Man | 129 |
| 7.2. | Produkte aus GT I-Ansätzen - Einfluß von GDP-Mannose | 131 |
| 7.2.1. | Enzymatische Hydrolyse | 131 |
| 7.2.2. | Gelfiltration der Produkte | 134 |
| 8. | In vivo-Einflüsse auf die Glucosyltransferasen | 137 |
| 8.1. | Gibberellinsäure $GA_3$ | 137 |
| 8.2. | Lanthanchlorid | 137 |
| 8.3. | NDA - ein Wachstumsregulator | 138 |
| IV. | DISKUSSION | 140 |
| 1. | Glucosyltransferasen in Zellkulturen | 141 |
| 2. | Lokalisierung der Glucosyltransferasen | 143 |

3. Charakterisierung der Glucosyltransferasen im in vitro-Test 145

4. Charakterisierung der Produkte 153

5. Solubilisierung der Glucosyltransferasen 155

6. Die lösliche Glucosyltransferase GT IsU - Beschreibung eines Phänomens 158

7. Substrate der ß-1,4-Glucansynthetasen 161

8. Glucosyltransferasen IG und IU und Glucomannansynthese 163

9. Beeinflussung der Glucosyltransferasen in in vivo-Versuchen 166

10. Perspektiven 167

V. ZUSAMMENFASSUNG 169

VI. LITERATUR 173

## I. EINLEITUNG

> "..., it will be necessary to understand how the interconnected and/or interacting polymers of the wall are physically arranged throughout the wall and how the cell wall polymers are synthesized before a sophisticated understanding of the biology and chemistry of plant cell growth is realized." (MCNEIL, DARVILL, FRY und ALBERSHEIM, 1984)

Die Zellwand ist eine mehr oder weniger starre Hülle, die die Pflanzenzelle einschließt. Sie muß fest genug sein, um dem Zellinnendruck standzuhalten, und bestimmt auch die Form der pflanzlichen Zelle. Andererseits muß gewährleistet sein, daß noch nicht ausdifferenzierte Zellen durch Streckung oder Teilung wachsen können, d. h. die Wand muß eine gewisse Plastizität aufweisen. Im Gewebeverband bildet die Zellwand sozusagen ein Gerüst, das der Pflanze ihre Form und Stabilität verleiht. Die Wand wird von der Zelle synthetisiert. Bereits 1897 konnte TOWNSEND zeigen, daß plasmolysierte Zellen von Elodea und Gaillardia in der Lage waren, eine neue Zellwand außerhalb der Plasmamembran zu regenerieren. Beim Teilungs- und Streckungswachstum unterliegt die Zellwand - oder Teile der Wand - einer gewissen Umstrukturierung. Da die Wand beim Streckungswachstum nicht dünner wird (PRESTON, 1982; Übersichtsartikel von DEY und BRINSON, 1984) muß Zellwandmaterial neu gebildet und den bereits bestehenden Strukturen an- oder eingelagert werden. Bei der Zellteilung wird, ausgehend von der Mittellamelle ein neuer Wandabschnitt an bereits vorhandene Zellwände angebaut. Weitere Modifikationen der Wand erfolgen bei der Ausbildung der Sekundärwand, die zum Teil in Zusammenhang mit Differenzierungsprozessen, z. B. zu Schließzellen, Fasern oder tracheidalen Elementen zu sehen sind. Einlagerungen von Phenylpropanen (Lignifizierung) bei der Verholzung, was zu einer erhöhten mechanischen Festigkeit führt oder von phenolischen Verbindungen (Gerbstoffen), die ein Schutz gegen mikrobielle Zersetzung bilden, seien als weitere Modifikationen der Zellwand erwähnt.

Die Erforschung der Zellwand kann man in drei Teilbereiche gliedern:

1. Zusammensetzung und Struktur der Zellwand und die daraus resultierenden mechanischen Eigenschaften.
2. Die Biosynthese der Zellwandbestandteile und ihre Integration in eine funktionsfähige Wand.
3. Regulationsvorgänge bei der Wandbildung und Wachstumsprozessen.

Diese Bereiche sind aber nicht als isolierte Problempunkte zu betrachten. Vielmehr sind die Übergänge von einer Problematik in die andere fließend, und Fortschritte können nur erzielt werden, wenn die Erkenntnisse im Zusammenhang betrachtet werden. So ist z. B. die Zuordnung in vitro meßbarer Enzyme zu Struktureinheiten der Zellwand für ein Verständnis der Regulationsmechanismen, die bei der Zellwandbildung eine Rolle spielen, eine wichtige Voraussetzung.

Struktur der pflanzlichen Zellwand

> "...the overall complexity of these structures, and the technical problems associated with their study, suggests that a complete picture of the cell wall will not be available in the near future." (DEY und BRINSON, 1984)

Solange die pflanzliche Zelle in der Lage ist zu wachsen, ist die sie umgebende Zellwand relativ dünn. Man spricht von einer Primärwand. Sie besteht zu 90 % aus Polysacchariden, und der Rest sind Proteine (ALBERSHEIM et al., 1977). Der Anteil an Cellulose ist gering und beträgt etwa 20 - 30 % der Polysaccharide (Übersichtsartikel MCNEIL et al., 1984). Nachdem die Zelle ihr Wachstum abgeschlossen hat, setzen Differenzierungsprozesse ein. Diese sind begleitet von einer Wandverdickung und führen zu bestimmten Formen und spezialisierten Eigenschaften der Zellen. Man spricht von einer Sekundärwand, die für Zellen verschiedener Gewebe charakteristisch ist. Der Cellulosegehalt der Sekundärwand ist viel größer (40 - 60 %) als in der Primärwand.

Der Aufbau der Primärwand wurde in vielen Arbeiten untersucht. Als Objekte dienten Hypocotyl-Stücke von Dikotyledonen oder Koleoptilen von Monokotyledonen (DEY und BRINSON, 1984). ALBERSHEIM et al. (1977) benützten zur Untersuchung der Primärwand Zellkulturen von u. a. Ahorn, Weizen, Reis und Gerste.

Die Aufklärung der Struktur der Wand beinhaltet drei Komplexe. Zunächst muß geklärt werden, welche monomeren Bausteine in verschiedenen Zellwandfraktionen enthalten sind. Daran schließt sich die Frage an, welche Substanzklassen vorkommen und wie die Monomeren miteinander verknüpft sind. Dazu müssen Methoden gefunden werden, mit denen verschiedene Makromoleküle so schonend wie möglich aus der Wand heraus gelöst werden können. Schließlich will man wissen, in welcher Weise die makromolekularen Bestandteile zu einem komplexen, dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind.

Eine Reihe von Techniken stehen zur Verfügung. Zunächst muß die Zellwand in ihre einzelnen Komponenten zerlegt werden. Dabei ist die Gefahr groß, daß Strukturen und Bindungen zerstört werden und man so zu falschen Schlüssen kommt. Eine grobe Fraktionierung wird durch Extraktion der Zellwand mit EDTA-haltigen Puffern (Pektine) und Alkali (Hemicellulose) erreicht. Im nichtlöslichen Rest ist u. a. die Cellulose enthalten. Bei der Alkali-Behandlung werden auch Glycoproteine gelöst (nicht jedoch das Glycoprotein Extensin). Glycolipide lösen sich in einem Gemisch aus Chloroform und Methanol (BRETT, 1982). Eine weitere Auftrennung der einzelnen Fraktionen kann über Ionenaustausch- oder Gelfiltrations-Chromatographie erreicht werden. Eine Kontamination der Wandpräparation durch Stärke kann durch Amylase beseitigt werden. Durch spezifische Enzyme (z. B. ß-Glucanasen) können ebenfalls einzelne Wandkomponenten aufgelöst werden. Die Monomeren in den einzelnen Komponenten lassen sich nach der Hydrolyse (und gegebenenfalls Reduktion und Acetylierung) der Fraktionen mit Hilfe der Papierchromatographie, Papierelektrophorese oder Gaschromatographie identifizieren und im Falle der GC über einen Standard auch quantifizieren. Spezifische Hydrolasen können Aufschluß darüber geben, ob α- oder ß-Bindungen vorliegen und über welche C-Atome die Zucker verknüpft sind. Diese Methode wird durch die Reinheit und Spezifität der verwendeten Hydrolasen begrenzt. Eine Analyse der Bindungen mit chemischen Methoden bieten die Methylierungsanalyse und die Periodatoxidation mit anschließender Auftrennung der Zuckerderivate über Gas- bzw. Papierchromatograhie. Zur Identifizierung der getrennten Zuckerderivate wird auch eine Kombination aus Gaschromatographie und Massenspektrometry verwendet. Werden die Makromoleküle zuvor einer partiellen Hydrolyse unterworfen, kann die Sequenz der Zucker untersucht werden. Neuere Methoden wie Kern-Resonanz-Spektrometry (NMR) und "fast-atom-bombardment" Massen-Spektrometrie werden ebenfalls bei Strukturuntersuchungen eingesetzt (MCNEIL et al., 1984). Ein wichtiger Faktor ist die Größe einzelner Wandkomponenten. Sie kann z. B. über Viskometry oder Gelfiltration abgeschätzt werden (BLASCHEK et al., 1982). In einigen Fällen, z. B. bei zellwandregenerierenden Protoplasten können auch Färbereagenzien wie Calcofluor white und Anilinblau zur Charakterisierung der Wandbestandteile eingesetzt werden (ROBERTS et al., 1982; STONE et al., 1984). All diese Methoden können im Prinzip auch für die Analyse von in vitro synthetisierten Produkten herangezogen werden. Für den Nachweis von nicht radioaktiv markierten Zellwandkomponenten z. B. in Zellwandfraktion oder Säuleneluaten stehen verschiedene colorimetrische Tests zur Verfügung: für Hexosylreste Anthron, für Pentosylreste Orcinol und für Glycosyluronreste m-Hydroxybiphenyl (DEY und BRINSON, 1984).

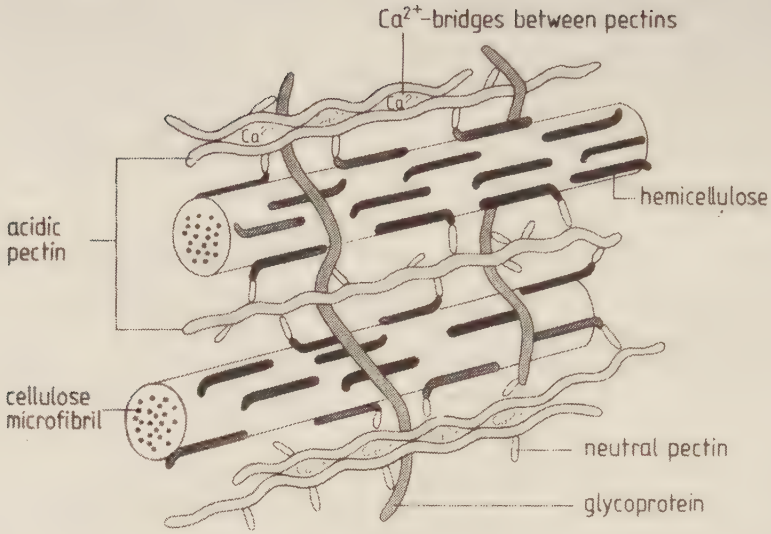


Abb. 1: Schematisches Modell der Primärwand (nach einem Diagramm aus "Molecular Biology of the Cell", Alberts-Bray-Lewis-Roff-Roberts-Watson, Garland Publishing Inc. New York, London, 1983)

ALBERSHEIM et al. (1977) stellten ein Modell auf, in dem die Hauptkomponenten der Primärwand zu einem dreidimensionalen Netzwerk verknüpft sind. In Abb. 1 ist ein erweitertes Modell abgebildet, welches auf das Modell von ALBERSHEIM zurückgeht. Die Primärwand besteht aus Cellulosefibrillen und Matrixmaterial (Hemicellulosen, Pektine, Proteine). Hemicellulosemoleküle binden über Wasserstoffbrücken an die Cellulosefibrillen. Saure Pektine (Beispiel: Rhamnogalakturonane) sind kovalent über neutrale Pektine (Beispiel: Arabinogalaktane) mit den Hemicellulosen (Beispiel: Xyloglucane) verknüpft. Durchzogen wird das Netzwerk von Glycoproteinen (Beispiel: Extensin), die möglicherweise an Pektine gebunden sind. Das Hydroxyprolinreiche Glycoprotein Extensin soll nach Vorstellungen von FRY (1982) selbst ein dreidimensionales Netzwerk bilden. Durch inter- und intrapeptidische Verknüpfungen über sogenannte Isodityrosin-Brücken (Tyrosin-Diphenylether-Bindung-Tyrosin) entsteht ein kovalent gebundenes, unlösliches Glycoprotein-Gerüst (MCNEIL et al., 1984).

In diesem Modell sind bei weitem nicht alle Komponenten der Primärwand enthalten. Als Arbeitshypothese für weitere Forschungen ist es allerdings sehr hilfreich. Das Modell wurde aus Ergebnissen an dikotylen Pflanzen abgeleitet. Die Primärwand der Monokotyledonen unterscheidet sich in einigen Punkten von der der Dikotyledonen. Es treten z. B. ß-1,3:ß-1,4-Mischglucane auf, und an Stelle von Xyloglucanen findet man vermehrt Xylane (MCNEIL et al., 1984). Primärwände von verschiedenen Geweben können sich ebenfalls in ihrer Zusammensetzung unterscheiden. Eine Sonderstellung nehmen sicher Zellen ein, die in flüssigem Medium kultiviert werden, und zellwandregenerierende Protoplasten, da sich von ihnen sehr leicht Wandbestandteile ablösen können (ASAMIZU und NISHI, 1980), so daß deren Primärwände nicht mit solchen von Zellen aus Pflanzengewebe der gleichen Art identisch sind (BLASCHEK et al., 1981).

Über die Synthese der Sekundärwand gibt es dagegen viel weniger Untersuchungen. Dies liegt zum Teil daran, daß es nicht so viele geeignete Objekte gibt und die Komplexitat der Strukturen und Prozesse noch größer ist als bei der Primärwand. Außerdem muß die bereits vorhandene Primärwand in die Untersuchungen mit einbezogen sein.

Synthese der Wandkomponenten

> "As Knowledge of the structural complexity of the polymers of the primary cell wall has been obtained, it has become apparent that the number of enzymes and, therefore, of genes involved in the growth of primary cell walls numbers in the many hundreds" (MCNEIL, DARVILL, FRY und ALBERSHEIM, 1984)

Bei der Teilung von Zellen wird zunächst eine Mittellamelle zwischen die beiden Tochterzellen eingezogen. Dies erfolgt über die Verschmelzung von Membranvesikel, die ihren Ursprung im Golgi-Apparat haben. Die Mittellamelle besteht hauptsächlich aus Pektinen und Hemicellulosen. Cellulosefibrillen wurden bisher nur an der Außenseite von Pflanzenzellen gefunden. Bei Acetobacter xylinum und den meisten Algen erfolgt die Synthese ebenfalls an der Zelloberfläche durch ein Enzymsystem, das in der Plasmamembran lokalisiert sein soll (DELMER, 1983). Diese Cellulose-Synthase-Komplexe sind möglicherweise identisch mit den von vielen Autoren beschriebenen "terminal complexes" oder "Rosetten", die in elektronenmikroskopischen Aufnahmen in der Plasmamembran gefunden werden (z. B. BROWN und MONTEZINOS, 1976 bei Oocystis apiculata; HERTH, 1983 bei Spirogyra).

GIDDINGS et al. (1980) schlugen ein Modell vor, nach dem bei der Bildung der Primärwand einzelne Partikelkomplexe (sogenannte Rosetten) in der Plasmamembran für die Synthese einzelner Cellulosefibrillen verantwortlich sind. Diese Mikrofibrillen bestehen aus 60 - 80 Glucanketten und liegen verstreut an der Membranaußenseite. Bei der Bildung der Sekundärwand gibt es große Areale von in mehreren Reihen angeordneten Rosetten. Jede Rosette bildet eine Mikrofibrille. Eine Rosetten-Reihe ist für die Bildung einer Makrofibrille verantwortlich, die durch Aggregation der einzelnen Mikrofibrillen ausgebildet wird. Viele parallele Reihen von Rosetten führen zu parallel ausgerichteten Cellulosefibrillen, was zu der bekannten Paralleltextur in Sekundärwänden führt. Das Modell wurde für die Alge Micrasterias denticulata entwickelt. Inzwischen gibt es aber Hinweise, daß solche Membrankomplexe auch bei höheren Pflanzen vorkommen (MUELLER und BROWN, 1980). Bei der Orientierung dieser "Cellulose-Synthase-Komplexe" wird eine Beteiligung von Mikrotubuli diskutiert (Obersicht von ROBINSON und QUADER, 1982).

Eine Ausnahme bilden einige Algen, die eine Pseudowand aus Celluloseschuppen besitzen. Bei Pleurochrysis scherffelii werden die Celluloseschuppen in den Cisternen des Golgi-Apparates gebildet und als solche nach außen geschleust und abgelagert (BROWN et al., 1969).

Die Beteiligung von Golgi-Apparat und Plasmamembran bei der Synthese und dem Transport von Wandbestandteilen ist allgemein anerkannt. Im Falle von zellwandlokalisierten Glycoproteinen kommen die Membranen des ER noch dazu. Radioaktiv markierte Glucose wird von Zellen aufgenommen und ihr Weg über Golgi-Cisternen und Vesikel bis zur Zellwand läßt sich bei anschließender Inkubation in nicht markierter Glucose verfolgen (Obersicht NORTHCOTE, 1977). Die Hemicellulosen und Pektine werden im Gegensatz zur Cellulose im Golgi-Apparat synthetisiert. Die Synthese von Zellwandkomponenten wird mit Hilfe radioaktiv markierter Substrate untersucht. Zellen, denen Glucose angeboten wird, nehmen diese auf und benützen sie zum Teil für die Synthese von Zellwandpolysacchariden. Zellfreie Homogenate können Glucose dagegen nicht mehr für diesen Zweck verwerten.

Die eigentlichen Substrate für Enzyme, die an der Synthese von Zellwandpolysacchariden beteiligt sind, sind Zucker-Nukleotide. Im Gegensatz zur Stärke- und Glycogensynthese (LAVINTMAN et al., 1974), wo ADP-Glucose beteiligt ist, sind es bei der Synthese von ß-Glucanen UDP- und GDP-Zucker (NORTHCOTE, 1977). Zwei Cellulosesynthasen aus Bakterien und Pflanzen sind

registriert. Das Substrat der ersten ist UDPG (EC 2.4.1.12), bei der anderen wird GDPG als Substrat angegeben (EC 2.4.1.29). In beiden Fällen ist es besser, zunächst von ß-1,4-Glucansynthetasen zu sprechen, zumal eine in vitro-Synthese von fibrillärer Cellulose bisher nicht gelang (DELMER, 1983). Eine ß-1,3-Glucansynthetase (EC 2.4.1.34) in Pflanzen verwendet ebenfalls UDPG als Substrat. Die beiden Glucansynthetasen mit UDPG als Substrat entsprechen den Glucansynthetasen I (ß-1,4) und II (ß-1,3) nach RAY (1979), die als Leitenzyme der Golgi-Membran und der Plasmamembran gelten. Bei der GDPG:1,4-ß-D-Glucan-4-ß-D-Glucosyltransferase könnte es sich um ein Enzym handeln, das bei der Glucomannansynthese beteiligt ist (VILLEMEZ, 1971). Die in vitro gemessenen Enzymaktivitäten sind oft nicht ausreichend charakterisiert, und der Bezug zu in vivo vorkommenden Makromolekülen nicht hergestellt.

ß-Glucansynthese in zellfreien Systemen

In früheren Arbeiten wurde oft von einer Cellulosesynthese in vitro berichtet (BARBER et al., 1964; FLOWERS et al., 1969; SHORE und MACLACHLAN, 1975 mit GDP-Glucose und BRUMMOND und GIBBONS, 1964; ORDIN und HALL, 1968; FRANZ und MEIER, 1969 mit UDP-Glucose). DELMER (1977) wies aber darauf hin, daß "Much of the confusion in the literature resulted from inadequate proof of structure of the reaction product, and especially from the by-now-disproven notion that insolubility of the product of the reaction in hot alkali is sufficient evidence to claim cellulose synthesis." Hinzu kommt, daß über die Definition von Cellulose unterschiedliche Vorstellungen existieren. Bei Cellulose im engeren Sinne handelt es sich um halbkristalline Anordnungen von ß-1,4-Glucanketten zu sogenannten Cellulose-Fibrillen. Die Kettenlänge ist sehr hoch (DP 2000 - 6000 in Primärwand-Cellulose) und die Fibrillen sind unlöslich. Die in vitro-Synthese solcher fibrillärer Cellulose ist noch niemandem gelungen. In späteren Arbeiten wurde daher vorsichtigerweise über die in vitro-Synthese von ß-1,4-Glucanen berichtet bzw. von ß-1,4-Glucansynthetasen.

Die Synthese von solchen ß-1,4-Glucanketten, die oft sehr kurz sind, gelingt in vitro ohne weiteres. Allerdings bleibt im Einzelfall nachzuprüfen, welche Rolle diesen ß-1,4-Glucanen beim Wandaufbau zukommt. Möglich wäre eine Beteiligung bei der Cellulosesynthese aber auch bei der Bildung von Xyloglucanen oder Glucomannanen und sogar als kurze ß-1,4-Glucansequenzen in Glycoproteinen und Glycolipiden (BROWN und KIMMINS, 1979; HOPP et al., 1978; GARCIA und MUDD, 1980). Es ist anzunehmen, daß für die Synthese dieser Glucanketten verschiedene Enzyme verantwortlich sind.

Die Synthese von ß-1,3-glucosidisch verknüpften Glucanen ist in vitro ebenfalls leicht möglich. Die Syntheseraten sind dabei viel höher als bei der Synthese von ß-1,4-Glucanen. Verantwortlich dafür ist ein Enzym, das in der Plasmamembran lokalisiert ist und möglicherweise bei Verletzungen einen schnellen Wundverschluß gewährleistet oder bei Infektionen eine Barriere durch schnelle Callosesynthese aufbaut (Übersichtsartikel von COOPER, 1982).

Bei einigen Objekten, vor allem Gräser, wurde auch die in vitro-Synthese von Mischglucanen bestehend aus ß-1,3- und ß-1,4-glucosidischen Bindungen nachgewiesen (HENRY und STONE, 1982a). Auch in vitro-Synthesen von Xylan und Araban (ODZUCK und KAUSS, 1972), Galactan (PANAYOTATOS und VILLEMEZ, 1973), Mannan (FRANZ, 1973) sowie Polygalacturonsäuren (VILLEMEZ et al., 1965) wurden beschrieben. Angesichts der Fülle von Struktureinheiten in der Zellwand ist die Zahl der in vitro-Testansätze allerdings gering.

Enzympräparationen, die in vitro-Synthesen von ß-Glucanen erlauben, wurden aus Bakterien z. B. Acetobacter xylinum (GLASER, 1958; ALONI et al., 1982), Pilzen z. B. Saprolegnia monoica (FÈVRE und ROUGIER, 1981) und vielen mono- und dikotylen Pflanzen (Übersichtsartikel von DEY und BRINSON, 1984) isoliert. Es handelt sich immer um membranintegrale Proteine. Durch Trennung von Membranen über lineare Dichtegradienten und Charakterisierung der Fraktionen durch z. B. Leitenzyme, wurden die Plasmamembran (ß-1,3-Glucansynthetase) und Membranen des Golgi-Apparates (ß-1,4-Glucansynthetase) als Sitz dieser Enzyme ermittelt. In Plasmamembranen, der Ort, wo die Cellulose in höheren Pflanzen und den meisten Algen mit größter Wahrscheinlichkeit synthetisiert wird, konnte man bisher keine überzeugenden in vitro-Synthesen von ß-1,4-Glucanen messen. GIRARD und FÈVRE (1984) lokalisierten bei Saprolegnia monoica allerdings beide Glucansynthetasen in der Plasmamembran. Die ß-1,4-Glucansynthetase(n) des Golgi-Apparates werden in Zusammenhang mit der Bildung von Xyloglucanen (RAY, 1980; HAYASHI und MATSUDA, 1981) oder von Glucomannanen (ELBEIN, 1969; VILLEMEZ, 1971), wo sie die ß-Glucankette beisteuern, gesehen. Einige Autoren vermuteten, daß es sich bei diesem Enzym um Vorstufen oder Untereinheiten der Cellulosesynthase handelt, die sich auf dem Weg vom ER über den Golgi-Apparat zum Plasmalemma befinden (BRETT und NORTHCOTE, 1975). Die Produkte solcher in vitro-Synthesen sollten hinsichtlich Monomeren, Bindungstypen, Polymerisierungsgrad und Größe möglichst genau charakterisiert werden, damit sich verschiedene Aktivitäten besser voneinander abgrenzen lassen.

Ein großes Problem bildet die Stabilität der Enzymaktivitäten. Durch den Zellaufschluß werden viele Faktoren, die für ein reibungsloses Arbeiten der Enzyme von Bedeutung sein können, verändert. Der Zellinnendruck, der ein Anpressen der Plasmamembran an die Zellwand bewirkt, spielt z. B. eine große Rolle beim Streckungswachstum und möglicherweise auch bei der Regulation der im Plasmalemma lokalisierten Glucansynthetasen. In Funaria hygrometrica verschwinden Rosetten in der Plasmamembran bei leichter Plasmolyse sehr schnell (2 min), d. h. sie sind elektronenmikroskopisch nicht mehr nachzuweisen (SCHNEPF persönliche Mitteilung, 1985). Die Größe und Orientierung der beim Aufschluß entstehenden Membranvesikel ist ebenfalls ein wichtiger Faktor. Das Substrat muß den aktiven Zentren der Enzyme zugänglich sein. Nukleotidzucker werden von Protoplasten z. B. nicht aufgenommen und auch nicht für die Synthese von Wandmaterial verwertet. Die Zucker-Nukleotide müssen von der cytoplasmatischen Seite angeliefert werden. In angeschnittenen Gewebestücken aus Erbsenstengel-Segmenten wurde Glucose aus UDPG nur von verletzten Zellen in Zellwandmaterial eingebaut (MUELLER und MACLACHLAN, 1982). Große Proteinkomplexe in der Membran könnten beim Aufschluß in ihrer räumlichen Struktur oder Assoziation zu Mikrotubuli zerstört werden (ROBINSON und QUADER, 1981). Eine Abhängigkeit der Glucansynthese von einem bestimmten Trans-Membran-Potential fanden DELMER (1981) bei Gossypium hirsutum. Und ein letzter Punkt: In einigen Fällen wurde von einer Beteiligung bestimmter Lipid- und Protein-Zwischenstufen bei der Polysaccharidsynthese berichtet (HOPP et al., 1978). Das Zusammenwirken von möglichen Lipid und/oder Proteinintermediären und End-Akzeptoren der Glycosylreste könnte durch die Homogenisation der Zellen ebenfalls empfindlich gestört werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, verschiedene Glucosyltransferasen der Karotte, die möglicherweise bei der Primärwand-Synthese beteiligt sind, zu charakterisieren. Dies schließt eine Optimierung der Testbedingungen bezüglich der selektiven Messung einzelner Transferasen ebenso ein, wie eine Trennung der Membran-integralen Enzyme. Über die Solubilisierung aktiver Enzyme hätte man Zugang zu den herkömmlichen Methoden der Proteintrennung und Charakterisierung. Die Möglichkeiten zur Untersuchung von Regulationsmechanismen der Synthese, des Transportes zum Wirkort und der Aktivität der Enzyme bei Wachstumsprozessen wären dadurch erheblich verbessert.

Regulation der Zellwandsynthese

> "The control of cell enlargement by growth regulators must involve control of wall polymer synthesis, a subject about which very little is known." (MCNEIL, DARVILL, FRY, und ALBERSHEIM, 1984)

Die Bildung der Zellwand ist eine sowohl im zeitlichen Ablauf als auch in der räumlichen Strukturierung sehr komplexe Syntheseleistung der Pflanzenzelle. Eine Vielzahl von Wandbestandteilen müssen in koordinierter Weise synthetisiert und in definierter Weise zu einem funktionsfähigen Zellwandgeflecht verbunden werden. Hierbei sind möglicherweise auch Lektine beteiligt. Pektine werden z. B. nur während der Phase der Primärwandbildung synthetisiert, und eine Lignifizierung findet nur in der Sekundärwand statt. Andere Substanzen wie Callose werden in speziellen Fällen, z. B. bei der Bildung der Siebröhren des Phloems oder als Reaktion auf Verwundung gebildet.

Von besonderem Interesse sind Vorgänge, die bei der Zellstreckung ablaufen. Nach abgeschlossenem Teilungswachstum setzt in vielen Zellen eine Elongation ein. Die Zellen wachsen dabei um den Faktor 10 bis 100 in die Länge. Dies bedingt, daß sich die mechanischen Eigenschaften der Wand ändern. Das Netzwerk muß an bestimmten Stellen soweit gelockert werden, daß die Wand dem Turgor nachgeben und die Zelle sich verlängern kann. Zu einer Regulation der Dehnbarkeit der Zellwand können verschiedene Faktoren beitragen: die Sekretion von Enzymen, Wandpolymeren, Lektinen und Phenolen ebenso wie der Transport von Calcium und anderen Ionen in die Wand (Übersichtsartikel TAIZ, 1984).

Das Streckungswachstum vieler Gewebe wird durch Säure gefördert, ein Phänomen, das auch bei der Wachstumskontrolle durch Auxin eine Rolle spielt. Auxin stimuliert z. B. in Koleoptilen das Streckungswachstum. Es bewirkt eine Ansäuerung der Zellwand (HAGER et al., 1971; CLELAND, 1973). Diese erhöhte Protonenkonzentration ist Grundlage für eine Erhöhung der Dehnbarkeit der Wand. Eine Aktivierung lytischer Enzyme in der Wand und/oder eine direkte Wirkung auf säurelabile Bindungen in der Wand werden diskutiert (TAIZ, 1984). In welcher Weise Auxin den Prozeß der Wandlockerung und Neusynthese beeinflußt, ist aber noch nicht völlig geklärt. Auch andere Phytohormone können Einfluß auf die Zellwand ausüben, z. B. Gibberelline bei der

Zellstreckung bei Lactuca sativa (JONES, 1982) und Ethylen bei der Fruchtreifung (DEY und BRINSON, 1984).

In einer Reihe von Arbeiten wurden Einflüsse von Phytohormonen auf die Zellwand und ihrer Synthese untersucht. Eine Zusammenstellung der vielfältigen Effekte unter Einfluß von Phytohormonen findet man in einem Übersichtsartikel von TAIZ (1984). Einige wenige seien hier kurz erwähnt. LABAVITCH und RAY (1974) berichteten, daß bei Erbsen innerhalb 15 Minuten nach Inkubation in Auxin Xyloglucane freigesetzt werden. Eine Auxin-induzierte Freisetzung von Pektinen wiesen TERRY et al. (1981) nach. GOLDBERG und PRAT (1982) wiesen darauf hin, daß der Pektinmetabolismus in den ersten Phasen des Auxin-induzierten Wachstums eine wichtige Rolle spielen könnte, wogegen der Glucan-Stoffwechsel erst in späteren Phasen wichtig wird. Bei Vigna angularis stellten NISHITANI und MASUDA (1982/1983) fest, daß Auxin und Säure eine Änderung des durchschnittlichen Molekulargewichtes von Xyloglucanen bewirken. In einer unlöslichen Xyloglucanfraktion von Avena sativa wurde das gleiche Ergebnis gefunden (INOUHE et al., 1984). Dieselbe Arbeitsgruppe fand, daß Auxin eine Steigerung des durchschnittlichen Molekulargewichts der Pektine bewirkt (NISHITANI und MASUDA, 1981). Und SHANNON et al. (1984) berichteten, daß bei Solanum tuberosum offenbar ein Zusammenhang besteht zwischen der Extensin-Biosynthese und IAA-abhängigen Zellstreckungsvorgängen.

Für eine Beteiligung von lytischen Enzymen, die in der Zellwand lokalisiert sind, gibt es ebenfalls einige Hinweise. HUBER und NEVINS (1981, 1982) konnten mit LiCl eine Exo-ß-1,3-Glucanase und eine Endo-ß-Glucanase, gegen die sie Antikörper herstellten, aus der Zellwand von Zea mays isolieren. Diese Antikörper inhibierten das Auxin induzierte Wachstum und blockierten die Wandautolyse. In Pisum sativum fanden HAYASHI et al. (1984) zwei Auxin-induzierte Endo-ß-1,4-Glucanasen, die Xyloglucane abbauen können. Eine generelle Beteiligung solcher in der Zellwand lokalisierten Enzyme beim Streckungswachstum ist jedoch nicht bewiesen. Eine Erhöhung der netto-Zellwandsynthese durch Auxin wurde in all den Fällen beobachtet, wo Auxin die Wachstumsrate erhöht, und alle Oligosaccharid-Fraktionen scheinen gefördert zu werden (TAIZ, 1984; BAKER und RAY, 1965; NISHITANI und MASUDA, 1981).

Über Auswirkungen von Phytohormonen auf die Aktivität und Synthese von Enzymen, die an der Bildung der Zellwand beteiligt sind, gibt es sehr wenig Daten. Auxin fördert die Aktivität der Glucansynthetase I in Erbsen innerhalb von 15 Minuten (RAY, 1973a,b). Diese Stimulierung war nicht zu ver-

hindern durch Actinomycin D und Cycloheximid. Nach Auxin-Behandlung von Erbsen-Gewebestücken fanden SHORE und MACLACHLAN (1975) eine Glucansynthetase-Aktivität, die zuvor nur in Golgi-Membranen meßbar war, auch in Membranen des ER. WALTON und RAY (1982) fanden, daß Dekapitation das Wachstum und die Glucansynthetase I in Koleoptilen von Zea mays hemmt. Durch Zugabe von exogenem Auxin wird dieser Effekt verhindert.

Zellsuspensionskulturen als Modellsystem

Gewebekulturen als Versuchsmaterial haben in der Zellwandforschung einen großen Stellenwert. Das Modellsystem "Gewebekultur" bietet neben Einschränkungen eine Reihe von Vorteilen, gerade auch im Hinblick auf Untersuchungen zur Synthese der Zellwand. Besonders bei in Suspension kultivierten Zellen hat man verhältnismäßig einheitliches Zellmaterial zur Verfügung, das sich im Stadium der Primärwandsynthese befindet. Die Zellen lassen sich auf Grund ihrer hohen Teilungsaktivität sehr schnell vermehren, so daß genügend Ausgangsmaterial zur Verfügung steht. Effektoren (Phytohormone, Ionen, Hemmstoffe) lassen sich sehr gut applizieren, da die Zellen von flüssigem Medium umspült sind und Transportwege der Substanzen sehr klein sind. Der Stimulus kann so auf die meisten Zellen in gleicher Weise wirken, wohingegen bei der Verwendung von ganzen Pflanzen oder Pflanzenteilen mit Gradienten zu rechnen ist und verschiedene Zellen unterschiedlich starken Effektorwirkungen ausgesetzt sind.

In Suspension kultivierte Zellen bieten die Möglichkeit, spezielle Systeme zu entwickeln, die zur Problemlösung bestimmter Aspekte hervorragend geeignet sind, z. B. zellwandregenerierende Protoplasten (LANGEBARTELS et al., 1981; BLASCHEK et al., 1981); in der Zellteilung synchronisierte Zellen (AMINO et al., 1984); Systeme, in denen Zellstreckungsprozesse (MASUDA et al., 1984) oder Differenzierungsprozesse zu z. B. tracheidalen Elementen bei Einzelzellen ablaufen (FUKUDA und KOMAMINE, 1982).

Der Umstand, daß die flüssige Umgebung die Integrität der Zellwand beeinflußt, z. B. dadurch, daß bestimmte Wandbestandteile sich im Medium lösen, kann in manchen Fällen sogar ein Vorteil sein. Solche Wandkomponenten lassen sich relativ leicht ohne die Anwendung aggressiver Lösungsmethoden isolieren und analysieren. Man muß sich aber darüber im Klaren sein, daß die Ergebnisse nicht direkt auf Zellen aus pflanzlichen Geweben übertragen werden können.

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Versuchsobjekte

#### 1.1. Daucus carota

Als Ausgangsmaterial dienten in Suspension gehaltene Zellen einer anthocyanbildenden Linie von Daucus carota L. ($DC_b$). Die Kultur wurde 1966 aus einer afghanischen Kulturform der Karotte zunächst als Kalluskultur aus Wurzelzellen angelegt (ALFERMANN und REINHARD 1971). Durch Überführen von Kallusmaterial in flüssiges Nährmedium wurden die Zellen in Suspensionskultur gebracht. Die Zellen wurden in flüssigem I2a-Medium (SEITZ et al., 1985) auf einer Rundschüttelmaschine (Pilot Shake, Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz) bei 110 Upm und 26 °C im Dauerdunkel in 250 ml Erlmeyerkolben mit Watte-Mull-Stopfen kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurden jeweils 10 ml einer 7 Tage alten Kultur mit Hilfe einer abgesägten 10 ml Pipette in 60 ml frisches Nährmedium unter sterilen Bedingungen (clean bench, Laminar air flow class 100, Gelman Instrument) überimpft. Zu Beginn der Versuche war die Kultur 120 und beim Abschluß der Arbeiten 230 Passagen alt (1 Passage entspricht 7 Kulturtagen). Die Kultur, die nach dem Anlegen aus Kallus blau war, verlor im Laufe der Zeit (ca. 40 - 60 Passagen) die Fähigkeit, Anthocyan zu akkumulieren, und zeichnete sich durch ein gutes Zellteilungswachstum aus. Für die Versuche wurden Zellen vom 4. - 7. Kulturtag verwendet.

#### 1.2. Weitere Objekte

Für einige Vergleichsexperimente wurden ebenfalls in Suspensionskultur gehaltene Zellen von Gossypium hirsutum L. (cv. Stoneville) sowie Petroselinum crispum herangezogen.

### 2. Parameter zur Charakterisierung der Kultur

#### 2.1. Frischgewicht

Ein Aliquot der Kultur wurde über Glasfaserfilter (SM 13400, Sartorius) mittels einer Wasserstrahlpumpe trocken gesaugt und danach gewogen.

2.2. Trockengewicht

Hierzu wurden die Proben nach der Bestimmung des Frischgewichtes gefriergetrocknet (72 h; Martin Christ, Osterode) und anschließend gewogen.

2.3. pH des Kulturmediums

Der pH des Kulturmediums wurde aus dem Filtrat der abgesaugten Zellsuspension bestimmt.

3. Aufarbeitung der Zellen zur Isolierung der Glucosyltransferasen

Routinemäßig wurden die trockengesaugten Zellen in flüssigem $N_2$ eingefroren. Die Zellen konnten für mehrere Wochen bei -70 °C ohne Aktivitätsverlust der Enzyme gelagert werden. Alle Enzymaufarbeitungen wurden bei 0 - 4 °C durchgeführt.

3.1. Homogenisierung

3.1.1. Gefrorenes Zellmaterial

Die gefrorenen Zellen wurden in flüssigem $N_2$ zu feinen Pulver zermörsert. Nach Überführung des "Zellmehls" in ein Becherglas wurde Homogenisierungspuffer (Tris-Mes 100 mM, KCl 5 mM, Saccharose 350 mM, pH 7,6) zugesetzt und unter Rühren bis zum Auftauen stehengelassen.

3.1.2. Frisches Zellmaterial

In Fällen, in denen frisches Zellmaterial benötigt wurde (z. B. Membrantrennung über Saccharose-Gradienten), erfolgte der Zellaufschluß in einem Glas-Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit Teflonpistill (Braun, Melsungen) in Anwesenheit des Homogenisierungspuffers. Bei 900 Upm wurde der Kolben 12mal auf und ab bewegt, unterbrochen von kurzen Pausen, um ein Ewärmen des Homogenats zu vermeiden. Pro 1 g Frischgewicht wurden 1,5 ml Puffer verwendet.

## 3.2. Aufarbeitung des Rohhomogenats durch Zentrifugation

### 3.2.1. Differentielle Zentrifugation

Das aufgeschlossene Zellmaterial wurde durch Miracloth (Calbiochem, Päsel, Frankfurt) filtriert. Danach folgte eine Vorzentrifugation von 10 min bei 1200 g (Rotor SS34, Kühlzentrifuge Sorvall RC2-B, Du Pont, Newton USA). Der Überstand der Vorzentrifugation diente als Ausgangsmaterial für weitere Zentrifugationsschritte bei steigenden Drehzahlen für jeweils 40 Minuten (Rotor Typ 65, fixed angle, Ultrazentrifuge, Kontron TGA 65). Die Sedimente wurden in Resuspendierungspuffer (Tris-Mes 100 mM, KCl 5 mM, Saccharose 250 mM, pH 7,2) aufgenommen und in einem Glas-Teflon-Homogenisator resuspendiert.

### 3.2.2. Membrantrennung über lineare Dichtegradienten

Für Aufarbeitungen über lineare Gradienten wurde nur frisches Zellmaterial verwendet. Die linearen Saccharose-Gradienten (32 ml von 13 - 45 % w/w) wurden mit einem Gradientenmischgerät hergestellt (Gradientenpuffer Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2). Die Enzymproben (7 ml, 1200g Überstand der Vorzentrifugation) wurden auf 11 % (w/w) Saccharose eingestellt, überschichtet und bei 27000 Upm (Swingout-Rotor SW27, Kontron TGA 65) für 3 bzw. 15 h zentrifugiert. Die Gradienten wurden nach dem Lauf mittels eines ISCO-Fractionators (Modell 185, ISCO, Lincoln USA) in Fraktionen zerlegt, wobei die Extinktion bei 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet wurde (Absorbance Monitor UA5, ISCO). Die Saccharosekonzentration in den einzelnen Fraktionen wurde refraktometrisch (Abbé-Refraktometer, Carl Zeiss, Oberkochen, Württ.) bestimmt.

## 4. Charakterisierung der Gradientenfraktionen mit Hilfe von Leitenzymen

### Saure Phosphatase, α-Mannosidase, ß-Mannosidase

Die Aktivität der drei Hydrolasen wurde nach dem gleichen Prinzip bestimmt. Die Freisetzung von para-Nitrophenol aus verschiedenen Nitrophenylderivaten wurde gemessen (LEIGH und WALKER 1980). Als Substrate dienten PNP-Phosphat (Saure-Phosphatase), PNP-α-Mannopyranosid (α-Mannosidase) und PNP-ß-Mannopyranosid (ß-Mannosidase). Die Substrate (10 mM PNP-Derivate) wurden in Na-Citrat-Puffer (0,1 M, pH 4,5) gelöst. 0,4 ml dieses Substrat-Puffers

wurden für 5 min bei 25 °C vorinkubiert und danach der Test durch Zugabe von 0,1 ml Enzymprobe gestartet. Nach Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml Borat-Puffer (0,2 M, pH 9,8) abgestoppt und die Absorption des freigesetzten P-Nitrophenols bei 405 nm gemessen (HOPP et al. 1985). Proben, die vor der Zugabe von Enzymextrakt mit Borat-Puffer abgestoppt wurden, dienten als Leerwerte.

| | |
|---|---|
| Saure-Phosphatase: | 30 °C, Messung $\Delta E_{405}$ zwischen t = 0 und t = 30 min |
| α-Mannosidase: | 25 °C, Messung $\Delta E_{405}$ zwischen t = 0 und t = 30 min |
| ß-Mannosidase: | 25 °C, Messung $\Delta E_{405}$ zwischen t = 0 und t = 120 min |

## 5. Isolierung einer löslichen Glucosyltransferase

In hochtourigen Überständen (bis 310000g) und "overlay"-Fraktionen von linearen Gradienten konnte eine Glucosyltransferase gemessen werden, die als GT Is (s = soluble) bezeichnet wurde.

### 5.1. Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Mit 175000g Überständen (Rotor Festwinkel Typ 65, Kontron TGA 65) wurde eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung zwischen 0 - 50 % Sättigung in 10 % Schritten durchgeführt. Dazu wurde eine 100 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung verwendet, die mit konz. $NH_3$ auf pH 7,5 eingestellt wurde. Der Extrakt wurde innerhalb von 15 min durch kontinuierliches Zutropfen der Stammlösung auf 10, 20, 30, 40 bzw. 50 % Sättigung gebracht und für weitere 15 min gerührt. Das ausgefallene Protein jeder Stufe wurde abzentrifugiert (30 min, 48000g) und in Puffer (Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2) resuspendiert. Der Überstand wurde für den nächsten Fällungsschritt verwendet. In späteren Versuchen wurde nur das Präzipitat zwischen 28 und 38 % Sättigung verwendet.

### 5.2. Entsalzung mit Sephadex G-25

Die resuspendierte Proteinlösung wurde auf eine Sephadex G-25-Säule (2,6 x 16 cm) aufgetragen. Das Gel war mit Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2 (in einigen Fällen aqua dest.) equilibriert. Die Elution erfolgte mit demselben

Puffer. Das gesamte Protein im Ausschlußvolumen wurde gesammelt und bei -70 $^{o}$C gelagert.

5.3. Trennung über Sephadex G-75

Das gefällte und entsalzte Protein wurde über eine Sephadex G-75-Säule (1,0 x 20 cm) getrennt. Die Säule war mit dem Elutionspuffer (Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2) equilibriert. Es wurden Fraktionen à 1 ml gesammelt.

5.4. Trennung über AcA 34

Gefällte und entsalzte Proben wurden auf eine Ultrogel AcA 34-Säule (LKB, Stockholm, Schweden; 2,6 x 30 cm) aufgetragen. Die Säule war mit Elutionspuffer (Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2) equilibriert. Bei einer Flußrate von 20 ml.h$^{-1}$ wurden Fraktionen à 2 ml gesammelt. Die Transmission bei 280 nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Für diese Auftrennung wurden folgende Geräte von LKB, Stockholm, Schweden, verwendet: Peristaltic pump, Ultrorac fraction collector, Uvicord II control unit und detector unit sowie ein recorder.

6. Lyophilisierung von Enzymproben

Membranpräparationen (40 min, 14000g) und Ammoniumsulfat-gefällte, entsalzte Proben wurden für 72 h lyophilisiert (Martin Christ, Osterode). Zur Messung der Enzymaktivitäten wurde das Lyophilisat in aqua dest. bzw. Puffer (pH-Versuch) resuspendiert.

7. Solubilisierung der Glucosyltransferasen

Für die Herstellung der Detergentien und Salzlösungen wurde der gleiche Puffer verwendet, in dem die Membranfraktionen resuspendiert wurden (Tris-Mes 100 mM, KCl 5 mM, Saccharose 250 mM, pH 7,2).

7.1. Solubilisierung durch Behandlung mit Salzen

Membranfraktionen wurden mit Salzlösungen (NaCl) in der Kälte im Verhältnis 1:1 versetzt und 60 min lang weitergerührt. Die Membranen wurden dann bei 126000g, 60 min (Rotor SW60) von den abgelösten Proteinen getrennt. Die Sedimente wurden in Salz-freiem Puffer resuspendiert.

7.2. Solubilisierung durch Behandlung mit Detergentien

Das gleiche Verfahren wie in II.7.1. wurde angewendet. Die Detergentien wurden in kleinen Portionen nach und nach zugegeben. Dadurch wurde die Konzentration der Detergentien langsam gesteigert, und es gab lokal keine unerwünscht hohen Konzentrationen der Wirkstoffe. Nach 45 min wurden die Proben zentrifugiert.

8. Das Glucosyltransferase-Testsystem

8.1. Vorbemerkung

Die Grundlage zur Bestimmung der Enzymaktivitäten bildete das von RAY (1979) beschriebene Testsystem. Der Einbau von radioaktiv markierter Glucose in Ethanol-unlösliche Produkte wird gemessen. Die Glucose wird im Test als UDP-Glucose angeboten.

RAY (1979) unterschied auf Grund der in Tab. 1 aufgeführten Kriterien zwei membranintegrale Enzyme, die er als Glucansynthetase I und II (GS I und II) bezeichnete.

Tab. 1: Charakterisierung der GS I und GS II

| | Glucansynthetase I | Glucansynthetase II |
|---|---|---|
| Substratkonzentration | nM - µM | mM |
| $MgCl_2$ | abhängig | unabhängig |
| Lokalisation | Golgi-Apparat | Plasmalemma |
| Produkt | ß-1,4-Glucan | ß-1,3-Glucan |

Erste Untersuchungen (INGOLD, 1982) zeigten jedoch, daß diese Einteilung nicht ohne Einschränkungen übernommen werden konnte. Produktanalysen ergaben, daß den Testansätzen nicht nur ein Produkt zuzuordnen ist, sondern in beiden Testsystemen verschiedene Produkte auftreten können und daher auch mit verschiedenen Enzymen gerechnet werden muß. Die Testbedingungen

scheinen nicht so spezifisch zu sein, daß nur ein einziges Enzym gemessen wird, besonders wenn man Rohhomogenate oder Gesamtmembranfraktionen als Enzymquelle benutzt. Bei der Karotte kann man außerdem mit dem Testsystem I auch Enzymaktivitäten in löslichen Proteinfraktionen messen.

Da die Identität der gemessenen Enzymaktivitäten nicht eindeutig geklärt war, wurde die Bezeichnung Glucosyltransferase (GT) eingeführt.

### 8.2. Vorstellung des Testsystems

Das zu Beginn der Versuche noch verwendete Testsystem nach RAY (1979) wurde im Laufe der Experimente modifiziert und ausgeweitet.

#### 8.2.1. Testansatz nach RAY (1979) zur Messung der Glucansynthetasen

Aus 230 µl Puffer (Tris-Acetat, 80 mM, pH 8), 15 µl UDP-$^{14}$C-Glucose (925 kBq.ml$^{-1}$), 65 µl $MgCl_2$ (1 M) bei GS I bzw. 65 µl UDP-Glucose unmarkiert (8 mM) bei GS II wurde ein Reaktionsgemisch hergestellt. Die jeweiligen Endkonzentrationen (Tabelle 2) im Enzymtest ergaben sich durch Mischung von 20 µl Reaktionsgemisch und 50 µl Enzymprobe.

Tab. 2: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den Glucansynthetasetest nach RAY (1979)

| | Endkonzentrationen im Test | |
|---|---|---|
| | GS I | GS II |
| Tris-Acetat pH 8 | 16,9 mM | 16,9 mM |
| UDP-$^{14}$C-Glucose$^{x)}$ | ~ 1 µM | ~ 1 µM |
| $MgCl_2$ | 60,4 mM | - |
| UDP-Glucose | - | 0,479 mM |
| Temperatur | 25 °C | 25 °C |
| Inkubationszeit | 5 min | 10 min |

$^{x)}$Die spezifische Aktivität der radioaktiven Substrate änderte sich je nach Lieferung und lag zwischen 10,8 bis 11 GBq.mmol$^{-1}$. Entsprechend schwankten auch die Endkonzentrationen geringfügig (1,17 - 1,18 µM), was bei den Auswertungen berücksichtigt wurde.

8.2.2. Modifizierte Testansätze zur Messung der Glucosyltransferasen[x)]

Für alle Ansätze mit mikromolarer Substratkonzentration wurde entsprechend der Tab. 2 die Bezeichnung Glucosyltransferase I (GT I) gewählt, für Ansätze im millimolaren Substratbereich GT II.

Das Testvolumen wurde auf 80 µl ausgedehnt, um die Möglichkeit zu haben, Effektoren in den in vitro-Test einbringen zu können. Der Testansatz bestand somit aus 20 µl Reaktionsgemisch, 50 µl Enzymprobe, 10 µl Effektorlösung bzw. aqua dest. Die Konzentrationen des Puffers und der Salze wurden so eingestellt, daß vergleichbare Verhältnisse zum ursprünglichen Test vorhanden waren. Das Reaktionsgemisch wurde hergestellt aus 220 µl Tris-Acetat (95 mM, pH 8), 15 µl radioaktiv markiertem Substrat, 75 µl Salzlösung ($MgSO_4$, 1 M für GT I; $ZnCl_2$, 16,5 mM für GT Is bzw. 75 µl einer Mischung aus UDP-Glucose (8 mM) und $CaCl_2$ (16,5 mM) für GT II). Zusätzlich wurde auch GDP-Glucose und GDP-Mannose als Substrat verwendet. Die Testbedingungen sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

8.2.3. Mannosyltransferase-Test

In Anlehnung an den Glucosyltransferase-Test I konnte eine Enzymaktivität gemessen werden, die Mannosylreste von GDP-Mannose auf ein alkoholunlösliches Produkt überträgt. Das Enzym wurde als Glycosyltransferase mit GDP-Man (GT GDP-Man) bezeichnet.

20 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus 210 µl Tris-Acetat (95 mM, pH 8), 15 µl GDP-$^{14}$C-Mannose, 10 µl GDP-Mannose unmarkiert (496 µM) sowie 75 µl $MgSO_4$ (1 M) wurden zusammen mit 50 µl Proteinprobe und 10 µl aqua dest. bzw. Effektorlösung inkubiert (siehe Tabelle 3). Die Durchführung des Tests erfolgte wie bei den Glucosyltransferasen (siehe II.8.3.).

---

x) Wurde der Enzymtest nach dem Testsystem nach RAY (1979) durchgeführt, so wird im Ergebnisteil an entsprechender Stelle darauf hingewiesen.

Tab. 3: Glycosyltransferasetest: Zusammensetzung und Testbedingungen (Konzentrationsangaben sind Endkonzentrationen im Test)

| | GT IU | GT IG | GT IsU | GT II | GT-GDP Mannose |
|---|---|---|---|---|---|
| Tris-Acetat pH 8 | 16,8 mM | 16,8 mM | 16,8 mM | 16,8 mM | 16,1 mM |
| Substrat radioaktiv[x)] | UDPGluc 1 µM | GDPGluc 1 µM | UDPGluc 1 µM | UDPGluc 1 µM | GDPMan 1 µM |
| Ionen | $MgSO_4$ 60 mM | $MgSO_4$ 60 mM | $ZnCl_2$ 1 mM | $CaCl_2$ 1 mM | $MgSO_4$ 60 mM |
| Substrat, unmarkiert | - | - | - | UDPGluc 0,48 mM | GDPMan 4 µM |
| Testvolumen | 20 µl Reaktionsgemisch + 10 µl Effektorlösung/aqua dest. + 50 µl Enzymlösun | | | | |
| Temperatur | 25 °C | 25 °C | 40 °C | 25 °C | 25 °C |
| Inkubationszeit | max. 5 min | 30 sec | max. 5 min | max. 10 min | max. 10 min |
| Stopp der Reaktion | 0,5 ml 5 % TCA + 1 min bei 100 °C | | | | |
| Produkt | unlöslich in Ethanol 70 % | | | | |
| Messung | Einbau von radioaktiv markierten Zuckern | | | | |

x) UDP-Glucose: 10,8 - 11 GBq/mmol; 925 kBq/ml
GDP-Glucose: 8,87 GBq/mmol; 740 kBq/ml
GDP-Mannose: 10,7 GBq/mmol; 925 kBq/ml

## 8.3. Messung der Glucosyl- und Mannosyltransferase-Aktivität

### 8.3.1. Durchführung des Tests

In Glaszentrifugenröhrchen wurden je 10 µl Effektorlösung bzw. aqua bidest und 20 µl des entsprechenden Reaktionsgemisches pipettiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Enzymprobe (50 µl) gestartet und im Wasserbad bei 25 °C bzw. 40 °C für die gewünschte Zeit inkubiert. Durch Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol wurde die Reaktion gestoppt. Kontrollen, die sofort nach dem Zusammenpipettieren abgestoppt wurden, ergaben einen gewissen Grundwert und wurden von den Meßwerten abgezogen. Vor allem im Fall von GDP-Glucose besteht die Gefahr, daß eine unspezifische Bindung an Kohlenhydrate erfolgt, die den Einbau von Glucose nur vortäuscht. Zudem wurde von KLEIN et al. (1981) berichtet, daß GDP-Glucose in Ethanol präzipitiert. Das Abstoppen der Reaktion wurde daher abgeändert und 0,5 ml TCA 5 % an Stelle des Alkohols zugesetzt. Nach Zugabe von 50 µl Präzipitationshilfe (hitze-

denaturierter 1500g Überstand eines Rohextraktes von Daucus carota) wurden die Teströhrchen für 1 min im kochenden Wasserbad gehalten. Bei den TCA-abgestoppten Proben erfolgt hierbei eine Hydrolyse der Substrate und unspezifische Bindungen werden drastisch reduziert. Auf die Durchführung von t = 0 Kontrollen konnte somit verzichtet werden. (Siehe Tab. 4)

Tab. 4: Vergleich der Produktausbeute von Ethanol- und TCA-abgestoppten Proben. Eingebaute Glucose ($pMole.min.^{-1}.mg^{-1}$ Protein)

| Enzymquelle | GT I U | | GT I G | |
|---|---|---|---|---|
| | Ethanol | TCA | Ethanol | TCA |
| 1200g Sediment | 2,75 | 2,56 | 19,6 | 20,9 |
| Ammoniumsulfat-Präzipitat (28 - 38 %) eines 175000g Überstandes | 2,5 | 2,96 | 0,21 | 0,11 |

Nach dem Kochen wurden die TCA-gestoppten Proben durch Zugabe von 1,5 ml Ethanol 98 % auf 70 % Ethanol eingestellt und bei 4 °C für mindestens 2 h zur Fällung stehengelassen.

8.3.2. Aufbereitung der Produkte

Um nichteingebautes Substrat und Hydrolysefragmente vom Produkt zu trennen, wurden die Proben viermal gewaschen. Die Produkte wurden 5 min bei 3000 Upm (Sigma Zentrifuge 3K-1) abzentrifugiert und in 2 ml Ethanol 70 % resuspendiert (10 sec Labor Mixer). Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt. Das Sediment der letzten Waschung wurde in 2 ml Ethanol 98 % aufgenommen und in Szintillationsgläschen überführt. Die Radioaktivität der synthetisierten Produkte wurde in 8 ml PPO/POPOP/Toluol Szintillator bestimmt. Die Umrechnung der gemessenen cpm in Mole eingebauter Glucose/Mannose erfolgte mit Hilfe der Methode des internen Standards.

8.3.3. Abstoppen des Tests über Sephadex G-75

Bei Testansätzen von GT IsU wurde die Inkubation zum Teil folgendermaßen beendet. Die Proben wurden nach Ablauf der Inkubationszeit auf Eis gestellt. Danach auf eine Sephadex G-75-Säule (1 x 20 cm) aufgetragen und mit Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2 eluiert. Die hochmolekularen Produkte erschienen im Ausschlußvolumen und wurden somit vom Substrat getrennt. Die Fraktionen, die Produkt enthielten, wurden gesammelt und zur weiteren Auftrennung über Ultrogel AcA 34 verwendet.

8.3.4. Abstoppen des Tests über PC

In einigen Fällen zur Messung von GT IsU wurde die Reaktion auf Eis abgestoppt. Der gesamte Testansatz wurde auf Papier aufgetragen und nach II.10.4. chromatographiert. Das gebildete Produkt blieb am Start liegen.

9. Charakterisierung der Glucosyltransferasen in vitro

Die Versuche zur Charakterisierung der verschiedenen Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Membranen durchgeführt, die bei 14000g (40 min) sedimentieren (vergl. Abb. 4). Für die Glucosyltransferase GT IsU wurde mit Ammoniumsulfat gefälltes Protein eines 175000g Überstandes verwendet (siehe II.5.1.).

9.1. Bestimmung des pH-Optimums

Die Membranen des 14000g Sediments wurden in Resuspendierungspuffer unterschiedlicher Protonenkonzentration (pH 5,5 - 8,5) resuspendiert. Für die GT IsU wurde das gefällte Protein über Sephadex G-25 mit aqua dest. als Elutionsmittel entsalzt, danach lyophilisiert und in aqua bidest. wieder gelöst. Diese Proteinlösung wurde 1:1 mit Tris-Acetat 10 mM, KCl 5 mM (pH 6,5 - 8,5) versetzt. Der pH der resuspendierten Enzym-Proben wurde kontrolliert. Für den Enzymtest wurde in diesem Fall ein ungepuffertes Reaktionsgemisch verwendet, welches an Stelle des Tris-Acetat-Puffers aqua dest. enthielt.

## 9.2. Einfluß der Substratkonzentration

Die Konzentration an markiertem Substrat wurde konstant gehalten und die gewünschte Substratkonzentration mit unmarkiertem Substrat eingestellt. In Fällen, in denen die Gefahr bestand, daß die Enzymaktivitat auf Grund der Isotopenverdünnung nicht mehr gemessen werden konnte, wurde das radioaktive Substrat in doppelter Konzentration eingesetzt.

## 9.3. Einfluß von Effektoren

Die Effektoren wurden in 8fach konzentrierten Lösungen angesetzt. Durch Mischung von 10 µl Effektorlösung in 80 µl Gesamt-Testvolumen wurde die gewünschte Endkonzentration eingestellt.

Untersucht wurde der Einfluß folgender Effektoren:

| | |
|---|---|
| Ionen: | $MgCl_2.6H_2O$, $MgSO_4.7H_2O$, $CaCl_2.2H_2O$, $ZnCl_2$, $MnCl_2.4H_2O$, $LaCl_3.H_2O$, KCl |
| Komplexbildner: | EDTA, EGTA |
| Nukleotide: | ATP, ADP, UTP, UDP, GTP, GDP |
| Konkurrenzsubstrate: | UDP-Glucose, UDP-Galaktose, UDP-Xylose, UDP-N-Acetyl-glucosamin, GDP-Glucose, GDP-Mannose, Glucose 1-phosphat |
| Inhibitoren: | Calcofluor white, Coumarin, 2,6-DCB,Papulacandin B, TH-Echinocandin B, TH-Echinocandin B-(2 aminoaethyl aether), NDA, Deoxyglucose |
| Detergentien: | Triton X100, Digitonin, Octylglucosid, Tween 80, SDS |
| Andere: | Cellobiose, Filipin, DMSO |

Soweit nicht anders angegeben, wurden die Effektoren in aqua bidest. gelöst. NDA wurde in Aceton vorgelöst und mit aqua dest. auf die gewünschte Konzentration gebracht. Filipin, Coumarin, 2,6-DCB, Papulacandin B und TH-Echinocandin B wurden in DMSO (100 %) vorgelöst. Die Konzentration von DMSO wurde in den Verdünnungsreihen auf 16 % gesenkt und betrug im Enzymtest 2 %. Bei den Versuchen mit den Inhibitoren wurde die Enzymlösung mit dem jeweiligen Effektor 10 min auf Eis vorinkubiert. Der Test wurde durch Zugabe des Reaktionsgemisches gestartet.

## 10. Charakterisierung der in vitro-Produkte

Die in vitro-Produkte der Glycosyltransferasen wurden nach verschiedenen Kriterien charakterisiert. Um die Ausbeute an radioaktiv markiertem Produkt zu erhöhen, sind folgende Modifikationen des Tests möglich:

1. Verlängerung der Inkubationszeit bis in den Sättigungsbereich der Kinetik
2. Erhöhung des Angebotes an markiertem Substrat
3. Vereinigung der Produkte aus parallelen Testansätzen

Von allen drei Möglichkeiten wurde bei Bedarf Gebrauch gemacht.

### 10.1. Löslichkeit

Durch Verwendung verschiedener Lösungsmittel können verschiedene Bestandteile aus Zellwänden herausgelöst werden. Das Löslichkeitsverhalten der Wandbestandteile wurde daher zu einem wichtigen Kriterium bei der Isolierung und Charakterisierung der Substanzen (BRETT, 1982; KROH und KNUIMAN, 1982; KATO et al., 1982).

Die in Ethanol 70 % unlöslichen Produkte wurden auf ihre Löslichkeit in verschiedenen Lösungsmitteln untersucht.

$H_2O$: Löslich sind z. B. monomere Zucker, Kohlenhydratketten mit geringem Polymerisierungsgrad (Oligomere); auch mit Glycopeptiden kann gerechnet werden.

Chloroform/Methanol/$H_2O$ (10:10:3 v/v/v): Löslich sind verschiedene Glycolipide.

SDS (1 %): Löslich werden Peptidketten, an denen auch Glycosylreste hängen können.

4 % KOH: Löslich sind verschiedene Hemicelluloseanteile.

24 % KOH: Löslich sind verschiedene Hemicelluloseanteile.

DMSO: Löslich ist Callose (ß-1,3-Glucan) (HEININGER, 1981)

TCA (5 %): Glycoproteine lösen sich nicht.

Die Produkte wurden in den verschiedenen Lösungsmitteln resuspendiert. Nach Inkubation (24 h, Zimmertemperatur) unter $N_2$-Atmosphäre oder Toluol wurden die Proben weiter aufgearbeitet. Änderungen von diesem Schema sind im Ergebnisteil angegeben.

Methode A: Durch Zentrifugation wurden die unlöslich verbliebenen Anteile abgetrennt und noch einmal mit Ethanol 70 % gewaschen, bevor sie zur Radioaktivitätsmessung in Ethanol 98 % aufgenommen und in Szintillationsflüssigkeit überführt wurden. Die ersten Waschüberstände wurden für weitere Analysen (PC, Gelfiltration) gesammelt.

Methode B: Die gesamte Probe wurde auf Glasfaserfilter (Whatman, O 25 mm GF/C) in einem Reihenfiltrationsgerät (Hölzel, Dorffen) aufgebracht. Die Filter wurden mit 2 x 1 ml des Lösungsmittels und danach mit 2 x 1 ml Ethanol 70 % gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die Filter zur Messung der Radioaktivität in Toluol PPO/POPOP-Szintillationsflüssigkeit überführt. Kontrollen erfuhren die gleiche Behandlung mit Ethanol 70 %

## 10.2. Stabilität

### 10.2.1. Säurestabilität

Ein herausragendes Merkmal von Cellulose ist neben ihrer schlechten Löslichkeit ihre große Stabilität gegen chemischen Abbau. Cellulose übersteht Hydrolyse-Bedingungen, bei denen die meisten anderen Zellwandbestandteile abgebaut werden, was man sich für eine Isolierung von "Cellulose" zu Nutze macht (UPDEGRAFF, 1969). Man kann davon ausgehen, daß alle Substanzen, die die Behandlung nach UPDEGRAFF nicht überstehen, keine Cellulose sind. Bei Strukturaufklärungen führt man oft zunächst eine Teilhydrolyse des Materials durch und analysiert die Bruchstücke.

TCA: Die Produkte wurden beim Abstoppen 1 min in TCA 5 % gekocht und danach mit Ethanol 98 % auf 70 % eingestellt.

TFA: Die Produkte wurden in TFA (2 N, 4 h) im Wasserbad unter dem Abzug gekocht. Die TFA wurde dann im Luftstrom abgeblasen und die Probe in 70 % Ethanol resuspendiert. Durch Zentrifugation (5 min, 3000 Upm, Sigma Zentrifuge 3K-1) wurden löslichgewordene Bruchstücke von dem stabilen Restprodukt getrennt. Die Überstände wurden im Luftstrom eingeengt und die Hydrolyse-

produkte papierchromatographisch getrennt (siehe II.10.4.). Der gesamte Hydrolyseansatz wurde teilweise auch direkt nach dem Einengen chromatographiert.

10.2.2. Stabilität in Alkali

Bei Glycoproteinen gibt die Stabilität der glycosidischen Bindung in Alkali Hinweise darüber, ob der Zucker O- oder N-glycosidisch an das Peptid geknüpft ist (LAMPORT 1980). Bei milder Alkali-Behandlung bleiben N-glycosidische Bindungen stabil, wohingegen die meisten O-glycosidischen Bindungen gesprengt werden (ß-Eliminierung). Bei starker Alkali-Behandlung werden auch N-glycosidische Bindungen gespalten.

10.2.2.1. Milde Alkali-Behandlung

Die Produkte wurden in 1 ml NaOH (0,1 N) resuspendiert und 24 h bei Zimmertemperatur oder 7 d bei 4 $^{o}$C inkubiert (HOPP et al. 1978). Die Proben erfuhren folgende Weiterbehandlung: 1. Nach Neutralisation (TCA 5 %) wurden die nichthydrolysierten Produktanteile abzentrifugiert und der Verlust an makierten Zuckern im Sediment bezogen auf die Kontrollen bestimmt; oder 2. der gesamte Ansatz wurde nach Einengung auf Papier aufgetragen und chromatographiert; oder 3. der gesamte Ansatz wurde über eine Sephadex G-75-Säule (1 x 20 cm) mit NaOH 0,2 N als Elutionsmittel aufgetrennt.

10.2.2.2. Starke Alkali-Behandlung (hohe Konzentration)

Hierzu wurden die Produkte in 1 ml NaOH (2 N) aufgenommen und 4 h bei 100 $^{o}$C inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter II.10.2.2.1. beschrieben.

10.3. Bindungsanalysen

10.3.1. Enzymatische Produktanalyse

Durch Behandlung der Produkte mit spezifischen Glucanasen und anderen abbauenden Enzymen (Proteasen) können diese unter Umständen wieder aufgelöst werden. Hieraus können dann Rückschlüsse auf die Art der Bindungen gezogen werden.

10.3.1.1. Behandlung der Produkte mit abbauenden Enzymen

Nach Punkt II.8.3. wurden in vitro-Produkte hergestellt und gewaschen. Bei Produkten, die für Produktanalysen hergestellt wurden, wurde keine Präzipitationshilfe zugegeben. Damit sollte verhindert werden, daß zusätzliche, nichtmarkierte Glucane die Wirkung der Enzyme auf die markierten Produkte herabsetzen. Nach der letzten Waschung wurden die Sedimente in 0,5 ml Puffer (Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM) für die Kontrolle bzw. Enzymlösung aufgenommen (Tab. 5). Die Proben wurden mit 50 µl Toluol überschichtet und die Reagenzgläschen mit Glasmurmeln abgedeckt. Die Inkubation erfolgte für 4 - 24 h bei den Optimumsbedingungen des verwendeten Enzyms. Die Abbaureaktion wurde durch Zugabe von 1,5 ml Ethanol (98 %) gestoppt. Nach Zugabe von 50 µl Präzipitationshilfe wurde die Probe 1 min gekocht. Nach Fällung in der Kälte (mindestens 2 h) wurden die Proben dreimal durch Abzentrifugieren und Resuspendieren in Ethanol 70 % gewaschen und die Radioaktivität in den Sedimenten bestimmt (siehe II.8.3.2.). Die Überstände der ersten Waschung wurden im Luftstrom eingeengt und für die Papierchromatographie verwendet.

10.3.1.2. Test der hydrolytischen Enzyme auf ihre Spezifität

Um die Wirkungsspezifität bzw. die Reinheit der Hydrolasen zu bestimmen, wurden sie mit bekannten Substraten, wie in II.10.3.1.1. beschrieben, inkubiert. Das Auftreten von reduzierenden Zuckern (Nachweis durch Anilinphthalat) zeigte Glucanaseaktivität an. Proteolytische Aktivitäten wurden über den Abbau von BSA bestimmt (siehe Tab. 5).

10.4. Papierchromatographie

Ganze Testansätze, gewaschene Produkte sowie die Abbauprodukte der chemischen und enzymatischen Hydrolysen wurden mittels Papierchromatographie näher charakterisiert.

Die Proben wurden punktförmig auf Chromatographiepapier (Whatman 3MM, Trennstrecke 50 cm) aufgetragen. Um gut auswertbare Chromatogramme zu erhalten, sollten mindestens 500 cpm in der aufgetragenen Probe enthalten sein. Es wurde eine absteigende Chromatographie für 28 h durchgeführt. Als Laufmittel wurde Isopropanol/Essigsäure/$H_2O$ 29:4:9 v/v/v (PONT LEZICA et al., 1978) verwendet. Zur Identifizierung der markierten Substanzflecken wurden Referenzen co-chromatographiert. Sie wurden vor dem Auftragen der zu

trennenden Probe beigemischt (10 - 20 µl, 5 $mg.ml^{-1}$ in 10 % Isopropanol). Da bei der langen Laufzeit die Laufmittelfront über das Papierende hinausläuft, wurde Glucose als Bezugspunkt gewählt. Als unmarkierte Referenzen wurden verwendet: Xylose (120), Mannose (111), Glucose (100), Galaktose (97), Laminaribiose (80), Maltose (66), Cellobiose (60). In Klammer sind die jeweiligen RG-Werte x 100 (in diesem Laufmittel) angegeben.

Nach Beendigung der Trennung wurden die Papierstreifen getrocknet und mit Anilinphthalat besprüht. Durch Erhitzen (5 min, 100 °C) wurden die Chromatogramme entwickelt, dabei bilden reduzierende Zucker rote bis braune Flecken. Zur Bestimmung der Radioaktivität wurden die Papierstreifen in 25 Segmente à 2 cm geschnitten und in 6 ml Toluol/PPO/POPOP gezählt.

Tab. 5: Testbedingungen der enzymatischen Produktanalyse. Testpuffer: Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM Inkubation 4 - 24 Stunden unter 50 µl Toluol

| Enzyme | Puffer pH 7 (mg/ml) | Puffer pH 5 (mg/ml) | Inkubation bei (°C) |
|---|---|---|---|
| Proteinase K | 0,5 | | 21 |
| Trypsin | 0,5 | | 21 |
| α-Amylase | 0,05 | | 21 |
| Cellulase | | 0,5 | 40 |
| Laminarinase | | 0,5 | 40 |
| Endo-1,3-ß-Glucanase[x)] | | 0,2 | 40 |
| Exo-1,3-ß-Glucanase[x)] | | 0,2 | 40 |
| Endo-1,4-ß-Glucanase[x)] | | 0,2 | 40 |
| Substrate | | | |
| BSA | 4 | | |
| Stärke (aufgekocht) | 10 | | |
| Cellulose | | 10 | |
| Carboxymethyl Cellulose | | 10 | |
| Laminarin (ß-1,3-Glucan) | | 10 | |

[x)] Diese Enzyme wurden freundlicherweise von Dr. E.T. Reese, US-Army Laboratories zur Verfügung gestellt.

## 10.5. Methylierungsanalyse[x)]

Die Bindungsanalysen über Methylierung und Auftrennung der Derivate mit Hilfe der Gaschromatographie wurde wie bei BLASCHEK et al. (1983) beschrieben durchgeführt.

Mit verschiedenen Enzymfraktionen wurden radioaktiv markierte Produkte hergestellt. Nach 4maligem Waschen in Ethanol 70 % wurden sie durch Begasen mit Stickstoff getrocknet. Als nicht markierte Carrier wurden pro Ansatz je 3 mg Laminarin und Cellulose zugegeben. Die Methylierung erfolgte nach HAKOMORI (1964) mit Kaliumdimsyl (PHILLIPS und FRASER 1981) und wurde einmal wiederholt. Nach der Methylierung wurden die Polysaccharide hydrolysiert und acetyliert (JANSSON et al. 1976). Die methylierten, acetylierten Zuckerderivate wurden gaschromatographisch auf einer Glassäule (180 cm x 2 mm, 100/120 Supelcoport "coated mit 3 % SP2340, Perkin Elmer) getrennt. Während der Trennung stieg die Temperatur von 180 $^{o}$C auf 200 $^{o}$C linear an (1 $^{o}$C.min$^{-1}$). Zur Bestimmung der Retentionszeiten wurde der Gasstrom über den FID (flame ionisation detector) geleitet. Zur Bestimmung der Radioaktivität durch Flüssigkeits-Szintillationsmessung wurde der Gasstrom vor dem FID abgezweigt und in Fraktionen über Silicon-beschichtete Glaskügelchen geleitet. Diese wurden zur Zählung in Szintillationsflüssigkeit überführt (PREHM und SCHEID 1978). Die Retentionszeiten wurden mit Kapillar-GC und GC-Massenspektroskopie überprüft.

## 10.6. Gelfiltration

Die Größe der gebildeten Produkte wurde durch Gelfiltration über eine Sephadex G-50-Säule (1 x 20 cm) und eine Sephadex G-75-Säule (1 x 25 cm) abgeschätzt. Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens wurde Dextran blue (MG 2 x $10^6$) verwendet. Mit Kaliumbichromat wurde die unter Grenze des Trennvermögens festgelegt. Der Trennbereich für Dextrane wird für Sephadex G-50 mit 500 - 10000 (Proteine 1500 - 30000) und für Sephadex G-75 mit 1000 - 50000 (Proteine 3000 - 80000) angegeben. Die Säulen wurden vor der Verwendung mit dem jeweiligen Elutionspuffer equilibriert.

---

x) Diese Analysen wurden von Dr. W. Blaschek, Regensburg, durchgeführt, bei dem ich mich recht herzlich bedanken möchte.

Produkte von GT IsU: Bei diesem Enzym wurde a) der gesamte Testansatz auf die Sephadex G-75-Säule aufgegeben und mit Tris-Mes 10 mM, KCl 100 mM, pH 7,2 eluiert; b) das Ethanol-gewaschene Produkt in Borat-Puffer 10 mM, KCl 100 mM, pH 9,8 resuspendiert und mit demselben Puffer oder 0,2 M NaOH eluiert.

Die Produkte der anderen Enzyme sind nur teilweise wasserlöslich. Sie wurden in KOH (4 bzw. 24 %) gelöst und von der Säule mit 0,2 M NaOH eluiert. Fraktionen à 1ml wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 15 - 30 $ml.h^{-1}$ gesammelt. Die Fraktionen wurden quantitativ in 4 ml Unisolve 1 (Zinsser, Frankfurt) überführt und im Szintillationszähler die Radioaktivität bestimmt.

## 11. In vivo-Versuche

Verschiedene Effektoren wurden als Stammlösungen angesetzt und sterilfiltriert (SM 16534K, 0,2 µm Porenweite, Sartorius, Göttingen) der Suspensionskultur zugegeben. (Gibberellinsäure und Lanthanchlorid als wäßrige Lösungen; NDA gelöst in Aceton) Die Zellen wurden nach Punkt II.3.1.1. aufgearbeitet und die Aktivität der Glucosyltransferasen aus dem Rohhomogenat gemessen.

## 12. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt, die auf einer Farbkomplexbildung der Peptide mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 beruht. Als Eichprotein diente Rinderserumalbumin (BSA).

## 13. Kulturmedium, Puffer und Lösungen

### 13.1. Kulturmedium

Das für die Kultivierung verwendete Nährmedium I2a (SEITZ et al., 1985) ist eine Modifikation des Mediums von MURASHIGE und SKOOG (1962). Saccharose und Inosit wurden bei der Herstellung des Mediums eingewogen. Salze, Aminosäuren, Phytohormone und Vitamine wurden als Stammlösungen (100fach) zugesetzt. Der pH wurde bei Raumtemperatur auf 5,6 eingestellt, fällt aber beim Autoklavieren (20 min bei 115 °C) auf pH 5,3 ab. Eisen-EDTA wurde erst nach dem Autoklavieren steril zugegeben, um ein Ausflocken von Eisenkomplexen zu verhindern.

Tab. 6: Zusammensetzung des I2a-Mediums (in $mg.l^{-1}$)

| | | | |
|---|---|---|---|
| Saccharose | 30 000 | Nicotinsäure | 0,5 |
| m-Inosit | 100 | Thiamindichlorid | 0,1 |
| $NH_4NO_3$ | 1 650 | Pyridoxolhydrochlorid | 0,1 |
| $KNO_3$ | 1 900 | Indol-3-essigsäure (IAA) | 2,0 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 440 | (2,4-Dichlorphenoxy)-essigsäure (2,4-D) | 0,1 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 | Kinetin (6-Furfuryl-aminopurin) | 0,2 |
| $KH_2PO_4$ | 170 | pH (eingestellt) | 5,6 |
| $Na_2.EDTA$ | 37,2 | | |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 | | |
| KJ | 0,83 | | |
| $H_3BO_3$ | 6,2 | | |
| $MnSO_4.4H_2O$ | 22,3 | | |
| $Na_2MoO_4.5H_2O$ | 0,25 | | |
| $CuSO_4.5H_2O$ | 0,025 | | |
| $CoCl_2.6H_2O$ | 0,025 | | |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 8,6 | | |

Das Medium enthält Aminosäuren nach KOBLITZ und HAGEN (1962). Hydroxyprolin wurde durch Cystein (3 $mg^{-1}$) ersetzt.

13.2. Puffer und Lösungen

Die Puffer und Lösungen werden in der Reihenfolge ihrer Verwendung aufgeführt. Sie sind mit dem gleichen Index bezeichnet wie die zugehörige Methode.

Tris-Mes-Puffer: kalte Lösungen (4 °C) von Tris/KCl und Mes/KCl gleicher Molarität werden bis zur Einstellung des gewünschten pH-Wertes gemischt. Saccharose wird danach eingewogen und der pH überprüft.

3.1.

Homogenisierungspuffer: Tris-Mes 100 mM, KCl 5 mM, Saccharose 350 mM, pH 7,6

3.2.1.

Resuspendierungspuffer I: Tris-Mes 100 mM, KCl 5 mM, Saccharose 250 mM, pH 7,2

3.2.2.

Gradientenpuffer: Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2, Saccharose linear von 13/15 % - 38/45 % (w/w)

4.

Substratpuffer: Na-Citrat 0,1 M, pH 4,5; 10 mM PNP-Substrat (0,1 M Citronensäure, 0,1 M Na-Citrat)

Stoppuffer: Na-Borat 0,2 M, pH 9,8 (0,2 M Borsäure, 2 M NaOH)

5.1.

Ammoniumsulfatlösung: 100 % gesättigte Lösung (767 $g.l^{-1}$) wurde mit $NH_3$ Konz. auf pH 7,6 eingestellt

Resuspendierungspuffer II: Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2

5.2.

Elutionspuffer: Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2 (für Sephadex G-75 und AcA 34)

8.2.

Testpuffer: Tris-Acetat 80 bzw. 95 mM, pH 8

8.3.2.

Szintillationscocktail: 4 g Premix 4 (91 % PPO, 9 % Dimethyl POPOP) pro 1 l Toluol

9.3.

Effektoren: In DMSO wurden angesetzt: Filipin, Coumarin, 2,6-DCB, Papulacandin B, TH-Echinocandin B.

Filipin ist luft- und lichtempfindlich. Stammlösungen in DMSO wurden mit $N_2$ begast und bei -20 °C aufbewahrt.

Papulacandin B ist in kristallinem Zustand selbst bei -20 °C labil. Es wurde als Stammlösung in DMSO (-20 °C) gelagert.

NDA ist ebenfalls lichtempfindlich. NDA wurde in Aceton vorgelöst und mit aqua dest. die gewünschte Konzentration eingestellt.

Von allen Effektoren, die nicht oder ungenügend wasserlöslich sind, wurden Stammlösungen in DMSO (100 %) hergestellt. Sie wurden vor dem Versuch auf die gewünschte Konzentration in DMSO (16 %) gebracht.

10.3.1.
Hydrolysepuffer: Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 5 bzw. 7

10.4.
Laufmittel: Isopropanol/Eisessig/Wasser 29:4:9 (v/v/v)
Referenzzucker: jeweils 5 $mg.ml^{-1}$ in Isopropanol (10 %)
Sprühreagenz: 0,93 g Anilin und 1,66 g Phthalsäure werden in 100 ml wassergesättigtem 1-Butanol gelöst.

10.6.
Elutionspuffer: Borat 10 mM (Na-Borat/NaOH), KCl 100 mM, pH 9,8
NaOH 0,2 M
Tris-Mes 10 mM, KCl 100 mM, pH 7,2

12.
Testlösung: 25 mg Coomassie Blue G 250 in 12,5 ml Ethanol 95 % und 25 ml Phosphorsäure 85 % (w/v) vorlösen mit aqua bidest. auf 250 ml auffüllen und abfiltrieren.

## 14. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

### 14.1. Chemikalien

American Cyanamid Company, Bound Brook, N.J., USA:
Calcofluor White

Amersham Buchler, Braunschweig:
Guanosin-diphospho-D-[U-$^{14}$C]Mannose, Ammonium Salz; Uridin-diphospho-D-[U-$^{14}$C]Glucose, Ammonium Salz; Polyethylenglykol 4000

Boehringer, Mannheim:
ATP, ADP, n-Octylglucosid, Proteinase K, UDP-Glucose

Deutsche Pharmacia, Freiburg:
Sephadex G-25 fine, Sephadex G-50 coarse, Sephadex G-75

LKB, Bromma, Schweden:
AcA 34 Ultrogel

New England Nuclear, Dreieich:
Guanosin-diphospho-D-[U-$^{14}$C]Glucose, Natrium Salz

Serva, Heidelberg:
Cellulase, Digitonin, Triton-X-100

Sigma, München:
α-Amylase, BSA, Carboxymethylcellulose, Coomassie Brilliant Blue G 250, EGTA, GDP, GDP-Glucose, GDP-Mannose, IDP, Laminaribiose, Laminarin, MES, PNP-phosphat, PNP-α-Mannopyranosid, PNP-β-Mannopyranosid, UDP, UDP-N-Acetylglucosamin, UDP-Galaktose, UDP-Xylose

Zinsser, Frankfurt:
Premix 4, Unisolve I

Alle übrigen Chemikalien (p.a.) wurden von Merck, Darmstadt bezogen. Wäßrige Lösungen wurden in aqua bidest. angesetzt.

Bedanken möchte ich mich bei folgenden Personen und Firmen, die mir Präparate zur Verfügung stellten, die teilweise nicht käuflich sind:

Für Filipin U-5956 bei Dr. J. E. Grady, Upjohn Company, Kalamazoo, USA;
für Papulacandin B bei Prof. Dr. J. Nüesch, Ciba-Geigy, Basel, Schweiz;
für TH-Echinocandin B und TH-Echinodandin B-(2-aminoaethyl)-aether bei Dr. M. Dreyfuss, Sandoz Ltd., Basel, Schweiz;
für 2,6-Dichlorbenzonitril bei Dr. J. Konze, Bayer AG, Leverkusen;
für NDA (= Tetcyclacis) bei Dr. K. Grossmann, BASF, Limburgerhof;
für Endo-β-1,4-Glucanase (Streptomyces), Endo-β-1,3-Glucanase (Rhizopus QM 1032) und Exo-β-1,3-Glucanase (Sporotrichum dimorphosporum) bei Dr. E. T. Reese, Food Science Laboratory, US Army Research and Development Command, Natick, USA;
für 1,3: 1,4-β-Glucan Endohydrolase (E.C. 3.2.1.73, B. subtilis), 1,4-β-Glucan Endohydrolase (E.C. 3.2.1.4, Streptomyces sp.) und 1,3-β-Glucan Exohydrolase (E.C. 3.2.7.58, Euglena gracilis) bei Prof. Dr. B. A. Stone, Department of Biochemistry, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australia).

14.2. Verbrauchsmaterial

Calbiochem (Päsel), Frankfurt:
Miracloth

Sartorius, Göttingen:
Membranfilter SM 16534K

Vetter, Wiesloch:
Glasfaserfilter, Whatman GF/C, Whatman 3MM Papier

15. Abkürzungen

| | |
|---|---|
| 2,6-DCB | 2,6-Dichlorbenzonitril |
| A.sulfat | Ammoniumsulfat |
| ADP | 5´-Adenosindiphosphat |
| app. $K_m$ | apparente Michaelis-Konstante |
| app. Vmax | apparente maximale Reaktionsgeschwindigkeit |
| ATP | 5´-Adenosintriphosphat |
| ATPase | Adenosintriphosphat Hydrolase |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CCR | Cytochrom C Reduktase |
| cpm | Impulse pro Minute |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DP | "degree of polymerisation" |
| EDTA | Ethylendinitrilotetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglycol-bis-(ß-aminoäthyläther)-N,N´-tetraessigsäure |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| F | Filtrat = Rohhomogenat |
| FID | flame ionisation detector |
| $GA_3$ | Gibberellinsäure |
| GC | Gaschromatographie |
| GDP | 5´-Guanosindiphosphat |
| GDPG | Guanosindiphospho-Glucose |
| GDPMan | Guanosindiphospho-Mannose |
| GT IG | Glucosyltransferase mit GDPG (µM) als Substrat |
| GT Man | Glycosyltransferase mit GDPMan (µM) als Substrat |
| GT IsU | Glucosyltransferase "soluble" mit UDPG (µM) als Substrat |

| | |
|---|---|
| GT IU | Glucosyltransferase mit UDPG als Substrat |
| GT IIU | Glucosyltransferase mit UDPG (mM) als Substrat |
| GTP | 5´-Guanosintriphosphat |
| IAA | Indol-3-essigsäure |
| IDPase | Inosindiphoshat Hydrolase |
| IEW | Isopropanol-Eisessig-Wasser |
| I2a | Nährmedium für die Suspensionskultur |
| K | kilo - Index bei Angaben der Beschleunigung bei Zentrifugationen z. B. 14 K = 14000g |
| MES | 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure |
| MG | Molekulargewicht |
| NDA (=Tetcyclacis) | 5-(4-chlorophenyl)-3,4,5,9,10-pentaaza-tetracyclo-5,4,1,$0^{2,6}$,$0^{8,11}$-dodeca-3,9-dien |
| PC | Papierchromatographie |
| PEG | Polyethylenglycol |
| POPOP | 2,2´-Phenylen bis-(5-phenyloxazol) |
| PPO | 2,5-Diphenyloxazol |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)aminomethan |
| UDP | 5´-Uridindiphosphat |
| UDPG | Uridindiphospho-Glucose |
| UDP-Gal | Uridindiphospho-Galaktose |
| UDP-GlucNac | Uridindiphospho-N-Acetylglucosamin |
| UDP-Xyl | Uridindiphospho-Xylose |
| Upm | Umdrehung pro Minute |
| UTP | 5´-Uridintriphosphat |

## III. ERGEBNISSE

Während der Versuche zur Charakterisierung der Glucosyltransferasen ergaben sich einige neue Fragestellungen. Diese Aspekte wurden als gesonderte Punkte im Ergebnisteil dargestellt, obwohl Ergebnisse, die zur Klärung dieser Fragen dienen, auch bei den Charakterisierungsversuchen erhalten wurden.

### 1. Glucosyltransferasen in suspensionskultivierten Zellen

#### 1.1. Vergleich der spezifischen Enzymaktivitäten verschiedener Kulturen

Erste Versuche zur Charakterisierung von Glucansynthetasen wurden mit suspensionskultivierten Zellen von Daucus carota L. (Zellinie 1; $DC_b$ 1) durchgeführt (INGOLD, 1982). Die Kultur hat ein hohes Alter (Subkultivierung mehr als 230 Passagen), und im Laufe der Untersuchungen fiel auf, daß die Aktivität der Enzyme gewissen Schwankungen unterlag. In Tab. 7 sind die Enzymaktivitäten der Zellinien $DC_b$ 1 (bei unterschiedlicher Passagenzahl), spater angelegter Zellinien ($DC_b$ 3, 4 und 6) sowie einer Petersilie- und einer Baumwollkultur aufgelistet.

a) Der Vergleich zeigt, daß bei $DC_b$ 1 trotz Verwendung des optimierten Testsystems (nach Tab. 3) die spezifischen Aktivitäten von GT IU und GT IIU bei Zellen höherer Passagenzahl geringer sind, wenn man 7-Tage-alte Zellen verwendet. Diese Abnahme ist nur teilweise auf die lange Lagerung bei -70 °C zurückzuführen. Auch frisch aufgearbeitete Zellen ($DC_b$ 1/232) erreichen nicht mehr die Werte der jungen Kultur ($DC_b$ 1/92). Wurden dagegen Zellen verwendet, die bereits am 5. Kulturtag geerntet wurden, so erhält man wieder Werte, die denen der jungen Kultur bei 7 Tagen nahekommen. Für GT IG und GT IsU liegen keine Daten für $DC_b$ 1/92 vor, da die Modifikation des Testsystems erst später erfolgte. Auch bei GT IG ist die spezifische Aktivität bei Zellen, die früh (Tag 5 oder 6) geerntet wurden, höher. Auf GT IsU wird noch ausführlich in Punkt III.6. eingegangen.

b) Zellinien, die zu einem späteren Zeitpunkt ausgehend von Kalluskulturen in Suspension überführt wurden ($DC_b$ 3, 4, 6), liegen in den spezifischen Aktivitäten der Glucosyltransferasen im gleichen Bereich wie die Kulturlinie $DC_b$ 1. Bei $DC_b$ 6 fällt allerdings auf, daß GT IU und GT IG ver-

gleichsweise geringe Werte haben. In Zellen, die in $GA_3$-haltigem Medium ($DC_w$) kultiviert wurden, wodurch die Anthocyansynthese unterbunden wird (HINDERER et al., 1984), sind auch die spezifischen Aktivitäten der Glucosyltransferasen beeinflußt. Die Aktivitäten von GT IU und GT IG sind deutlich geringer als in Kulturen, die in $GA_3$-freiem Medium kultiviert wurden. Dagegen erfährt GT IIU eine Steigerung. Der niedrigere Wert bei $DC_w$ 1/21 könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Anwesenheit von $GA_3$ essentiell ist, da diese Kultur vor dem Aufschluß 2 Passagen in $GA_3$-freiem Medium kultiviert wurde.

Tab. 7: Spezifische Aktivität der Glucosyltransferasen in verschiedenen Kulturen. Einbau von Glucose in Ethanol (70 %) unlösliches Material (pMole.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ Protein) mit Rohhomogenaten als Enzymquelle. n.m. = nicht signifikant meßbar.

| Kultur | Passage (Wochen) | Zellalter (Tage) | GT IU | GT IG | GT IIU | GT IsU | Test nach Tab. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $DC_b$ 1 | 92 | 7 | 2,37 | - | 2000 | - | 2 |
| | 148 x) | 7 | 0,9 | 29,8 | 850 | 0,31 | 3 |
| | 203 x) | 6 | 0,8 | 32,6 | 850 | 1,01 | 3 |
| | 228 | 5 | 1,78 | 49,1 | 1833 | 0,7 | 3 |
| | 232 | 7 | 0,83 | 19,2 | 1266 | 0,5 | 3 |
| $DC_b$ 3 | 35 | 7 | 2,2 | - | 1466 | - | 2 |
| $DC_b$ 4 | 9 | 7 | 1,3 | - | 833 | - | 2 |
| $DC_b$ 6 | 63 | 7 | 0,56 | 24,4 | 1516 | 0,43 | 3 |
| $DC_w$ 1 | 4 | 7 | 0,58 | - | 4916 | - | 2 |
| | 14 | 7 | - | 3,2 | 5816 | - | 2 |
| | 21 x) | 7 | 0,25 | 7,25 | 2880 | 0,3 | 3 |
| BW | 31 x) | 7 | n.m. | 1,8 | 6660 | n.m. | 3 |
| PS | 375 x) | 7 | 0,26 | n.m. | 3560 | n.m. | 3 |

x) Zellen waren bis zur Verwendung bei -70 °C eingefroren (teilweise über 1 Jahr).

c) Suspensionskultivierte Zellen von Baumwolle (Gossypium hirsutum) und Petersilie (Petroselinum crispum) zeigen bemerkenswerte Unterschiede. Bei Baumwolle sind die GT IU und GT IsU unter den verwendeten Testbedingungen nicht nachzuweisen. Verwendet man GDPG, so erhält man in etwa den Glucoseeinbau wie mit UDPG bei Karottenzellen. Dort ist allerdings der Einbau aus GDPG viel höher. Bei Petersilie findet man dagegen keine GT IG. Auch die GT IsU ist nicht nachweisbar. Die Aktivität der GT IU liegt an der Nachweisgrenze. Bei beiden Species sind dagegen sehr gute Aktivitäten der GT IIU vorhanden, die gleich hohe Einbauraten zeigen wie die $GA_3$-behandelten Karotten Zellen. Die Enzymtestsysteme wurden allerdings nicht mit diesen Kulturen eingestellt. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß unter Testbedingungen, die für dieses Material optimal sind, auch die GT IU und GT IG höhere Einbauraten zeigen.

Alle weiteren Versuche wurden mit Zellen von Daucus carota ($DC_b$ 1) durchgeführt.

## 1.2. Kulturalterabhängigkeit der Glucosyltransferasen in Suspensionskulturen von Daucus carota

Der Vergleich der spezifischen Aktivitäten der Glucosyltransferasen verschiedener Kulturen zeigte, daß die Zellen gewissen Änderungen unterliegen. Auch der Umstand, daß ursprünglich "blaue" Kulturen (Anthocyan-akkumulierend) im Verlauf der Subkultivierung "weiß" werden, belegt dies. Eine Charakterisierung der Kultur sollte daher von Zeit zu Zeit durchgeführt werden.

### 1.2.1. Wachstumsverhalten der Kultur

Die Änderung des Frischgewichts zeigt ein Verhalten wie es aus Wachstumskurven von "batch"-Kulturen bekannt ist. Einer Anlaufphase (0. - 2. Tag) folgt die Wachstumsphase (2. - 8. Tag), die dann in eine stationäre und Absterbephase übergeht (9. - 10. Tag). Die größte Zunahme gegenüber dem Vortag findet vom 4. auf den 5. Kulturtag statt. Die Zunahme des Trockengewichts setzt früher ein und erreicht den Maximumswert bereits am 7. Tag. Das Maximum der Zunahme gegenüber dem Vortag ist bereits 2 Tage früher (2. auf 3. Tag) erreicht. Das im Rohhomogenat meßbare Protein läuft der Entwicklung des Trockengewichts exakt parallel (Abb. 2c). Nach dem Überimpfen steigt der Proteingehalt in den Zellen stark an. Dieser Anstieg setzt sich

bis zum 3. Tag fort und nimmt danach kontinuierlich ab, was teilweise auf eine reduzierte Proteinsyntheserate (NOÉ und SEITZ, 1982) sowie auf eine zunehmende Vakuolisierung der Zellen zurückzuführen ist.

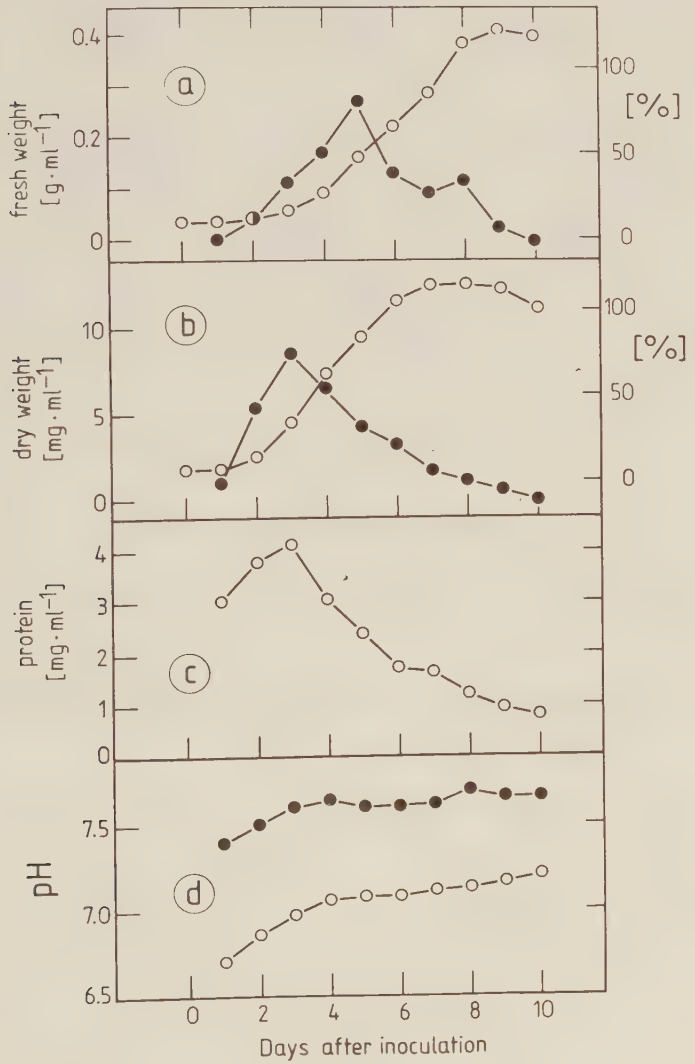


Abb. 2: Verlauf verschiedener Parameter einer $DC_b$-Suspensionskultur in Abhängigkeit des Kulturalters. (a) Frischgewicht. (b) Trockengewicht: Ausgefüllte Symbole zeigen die Zunahme in % gegenüber dem Vortag an. (c) Proteingehalt des Rohhomogenats (Filtrat durch Miracloth). (d) pH-Wert des Rohhomogenats (o-o); pH-Wert im Glucosyltransferase-Test (●-●), der sich durch Mischung der Enzymlösung mit Testpuffer einstellt.

Abb. 2d gibt den pH-Wert im Rohhomogenat wieder, wenn Zellen von unterschiedlichem Alter nach II.3.1. aufgeschlossen werden. Es wird deutlich, daß der pH bei jungen Zellen (1 - 3 Tage) unter 6 abfällt. Danach pendelt er um pH 7,1 beim Aufschluß von 4 bis 8 Tage alten Zellen.

Die zweite Kurve (o-o) gibt den aktuellen pH im Testansatz wieder. Sie wurde mittels großvolumigen Ansätzen aus Testpuffer und Rohhomogenat ermittelt. Da im Test auf 20 µl Testpuffer 50 µl Emzymlösung kommen, kann der pH der Enzymlösung großen Einfluß auf den aktuellen pH im Test haben. Es zeigt sich, daß mit Rohhomogenaten ab dem 3. Kulturtag sich im Test ein Wert um pH 7,5 einstellt. Dies entspricht den pH-Optima der Glucosyltransferasen (siehe Abb. 9). Bei der Verwendung jüngerer Zellen stellt sich ein Wert zwischen pH 7,4 - 7,5 ein. In der Regel wurden Zellen aufgearbeitet, die älter als 3 Tage waren.

1.2.2. Glucosyltransferasen im Verlauf der Kultivierung

Abb. 3a und b geben den Verlauf der Glucosyltransferase-Aktivitäten (absolute Enzymaktivität in cpm) wieder. Die Glucosyltransferasen GT IU und GT IG steigen nach dem Überimpfen an und erreichen ein Maximum am 3. Tag, um danach langsam wieder abzufallen. GT IIU verbleibt dagegen auf einem Plateau vom 2. bis zum 5. Tag und GT IsU hat ein Maximum am 4. Tag und ein weiteres am 7. Tag. Die Kurvenverläufe sind natürlich stark geprägt durch die Abnahme des Proteins im Rohhomogenat (Abb. 2c).

Diesen Einfluß kann man durch den Bezug auf konstante Proteinmengen ausschließen. Abb. 3c und d zeigen die spezifischen Aktivitäten der vier Glucosyltransferasen. Der Einbau von $^{14}$C-Glucose in pMole wurde pro mg Protein und 1 min Inkubationszeit berechnet. Die Kurvenverläufe der 4 Enzyme unterscheiden sich deutlich. GT IU befindet sich bereits auf einem hohen Niveau (Tag 1 - 8). Erst danach ist ein leichtes Absinken feststellbar. Bei GT IG findet man ebenfalls gleichmäßig hohe Werte von Tag 1 - 5. Der Abfall tritt aber bereits am 6. Tag ein, und die Enzymaktivität geht fast auf 0 zurück (Tag 9 und 10). GT IIU dagegen fällt nach dem Überimpfen leicht ab und erreicht erst am 5. und 7. Tag wieder Höchstwerte. Bei längerer Kultivierung sinkt auch sie ab. GT IsU hat vom 1. - 3. Tag sehr geringe Aktivität. Danach steigt sie langsam über ein Zwischenmaximum am 4. Tag an und erreicht am 7. und 8. Tag ihre höchsten Werte.

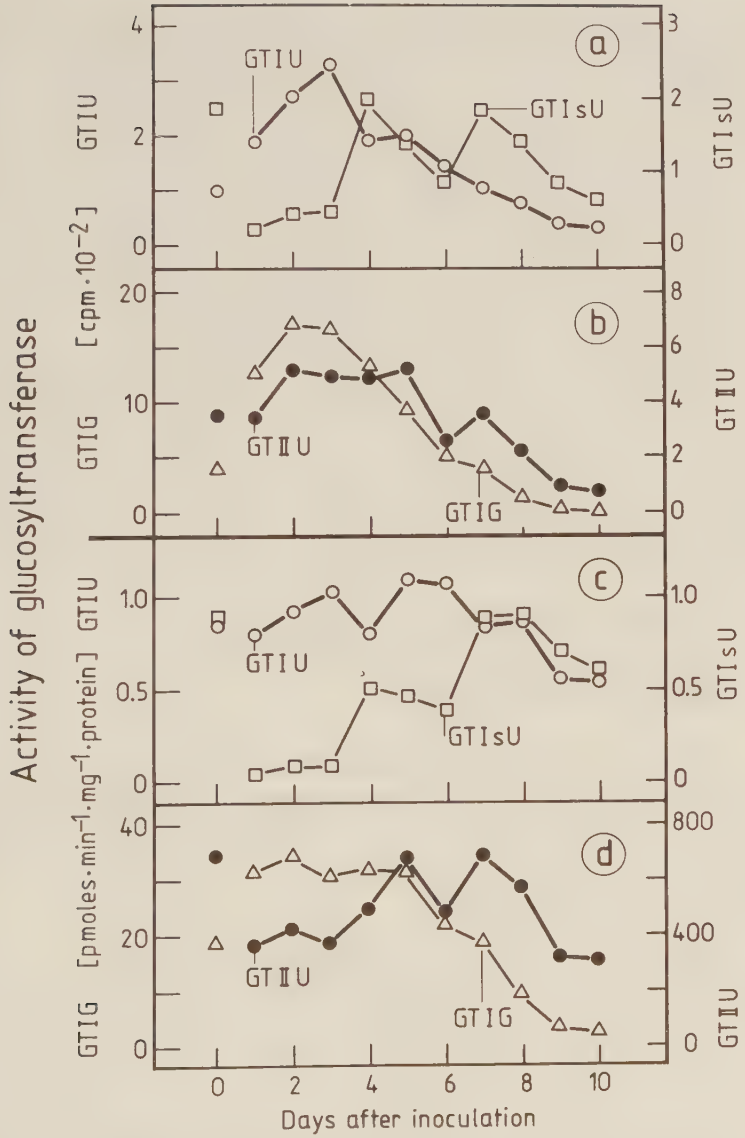


Abb. 3: Absolute (a, b) und spezifische (c, d) Aktivitäten der Glucosyltransferasen in Abhängigkeit des Kulturalters. Testbedingungen nach Tab. 3. Werte am 0. Tag (Oberimpftag) sind die Daten vom 7. Tag (Mutterkultur). Als Enzymquelle diente das Rohhomogenat.

Das Wachstumsverhalten der Kultur (Passage 231) sowie das der Glucosyltransferasen IU und IIU hat sich gegenüber früher (Passage 90; INGOLD, 1982) verändert. Die Kultur wächst schneller. Waren es früher am 7. Kulturtag 9 - 10 g Frischgewicht pro Kolben, so kann man nun bereits 18 - 20 g ernten. Das Maximum des Proteingehalts liegt ebenfalls um 2 Tage früher, und der Abfall der Kurve war damals nicht so abrupt. Frisch angelegte Kulturen, die Anthocyan produzieren, wachsen dagegen langsamer (HINDERER et al., 1984). Sie erreichen das Maximum an Trockengewicht erst am 11 - 12 Kulturtag, und das der Frischgewichtskurve liegt am 13. Tag. Die entsprechenden Maxima bei der verwendeten Kultur liegen am 7. bzw. 9. Kulturtag. Auch der Kurvenverlauf der absoluten Enzymaktivitäten von GT IU und GT IIU ist von diesen Änderungen betroffen. Sie erreichen ihr Maximum früher und das Absinken der Aktivität setzt um 3 bzw. 1 Tag früher ein. Die gegenüber früher reduzierten Enzymaktivitäten (Tab. 7) sind somit auf die veränderte Kulturentwicklung zurückzuführen. An Stelle von 7 Tage alten Zellen wurde dazu übergegangen, 4 - 5 Tage alte Zellen zu verwenden.

## 2. Isolierung der Glucosyltransferasen

### 2.1. Differentielle Zentrifugation

Abb. 4 zeigt die Verteilung der Glucosyltransferasen GT IU, GT IG und GT IIU in verschiedenen Sedimentfraktionen steigender g-Zahl bezogen auf das Rohhomogenat. Der Verlust an Protein während der Aufarbeitung betrug 10 %. Erheblich größere Verluste gab es bei GT IG und GT IIU (40 %). Bei GT IU dagegen lag die Ausbeute über 100 %.

Das meiste Protein in den Sedimentfraktionen fand sich bei 1,2 K und 14 K. Über 55 % verblieben im 175 K Überstand. Bereits in den Sedimentfraktionen 1,2 K und 14 K sedimentierte die gesamte meßbare GT IIU. Hier war auch die spezifische Aktivität am größten. Auch von der GT IG sedimentierte der Hauptanteil in diesen beiden Sedimenten. Es war aber auch noch GT IG-Aktivität in den Sedimenten zwischen 14 und 30 K sowie 30 und 60 K nachzuweisen. Selbst bei 100 K waren noch gut meßbare Werte zu erhalten, der Anteil lag aber nur bei 1,2 %. Von der GT IU fanden sich ca. 50 % im 1,2 K und 14 K Sediment, 18 % bei 100 K und 175 K und 36 % im 175 K Überstand. Die größten spezifischen Aktivitäten waren im 175 K und 14 K Sediment meßbar. Aber auch in den anderen Sedimenten waren sie immer größer als im Rohhomogenat. Am geringsten (hoher Proteingehalt) war sie im 175 K-Überstand. Bei diesem

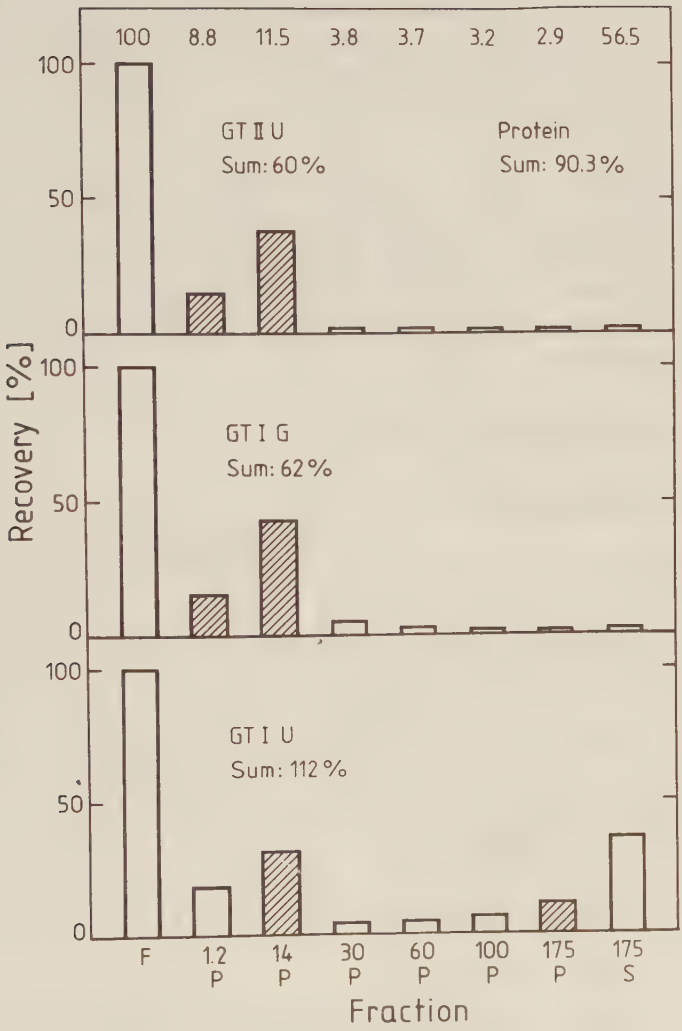


Abb. 4: Differentielle Zentrifugation - Verteilungsmuster der Glucosyltransferasen. Die Säulen repräsentieren den Anteil der Enzymaktivität in den verschiedenen Sedimentfraktionen (1,2 x 1000g bis 175 x 1000g), bezogen auf das Rohhomogenat (= Filtrat). Die Zahlenreihe im ersten Teildiagramm gibt die Verteilung des Proteins an. Die schraffierten Säulen bezeichnen die Fraktionen mit den höchsten spezifischen Aktivitäten. Testansätze nach dem Ausgangsschema (Tab 2).

Versuch wurde noch das Ausgangstestsystem benützt. Ein modifizierter Test für GT IsU stand noch nicht zur Verfügung. Die GT IsU arbeitet aber mit geringerer Aktivität auch im Testsystem für GT IU. Die Enzymaktivität, die im 175 K-Oberstand und Sediment gemessen wurde, ist auf die GT IsU zurückzuführen (siehe III.6.).

Da von allen Enzymen große Mengen bereits bei 14000g sedimentierten, wurde in der Folgezeit diese Fraktion für Charakterisierungsversuche herangezogen. Die GT IsU wurde aus dem löslichen Überstand durch Ammoniumsulfatfällung angereichert (siehe III.6.). Für besondere Fragen (GC-Analysen) standen aber auch Fraktionen zur Verfügung, die z. B. frei waren von GT IIU (30 und 60 K Sedimente).

## 2.2. Lineare Gradienten

### 2.2.1. Glucosyltransferasen

Beispiel 1 (Abb. 5): Enzymtest nach den Ausgangstestbedingungen (Tab. 2). Die Verteilung der Glucosyltransferasen IU, IG und IIU nach Trennung der Membranen über einen linearen Saccharose-Gradienten (15 - 45 % w/w, 15 h x 80000 $g_{av}$) ist in Abb. 5 wiedergegeben. Die höchste Aktivität der GT IIU findet sich um 40 % Saccharose. Zusätzlich ist ein Plateau im Bereich von 27 - 36 % vorhanden. Die GT IG bandet in einem einzigen "peak", der sein Maximum bei 31 % hat. Die Verteilung der GT IU ist dagegen vielschichtiger. Im Gradienten findet man zwei Maxima. Der erste Gipfel liegt bei 20 % und der zweite bei 31 % Saccharose. Auch im "overlay" ist eine gut meßbare Aktivität vorhanden. Bei dieser "löslichen" Enzymaktivität handelt es sich wiederum um GT IsU (siehe III.2.1.), die ebenfalls im GT IU Testsystem arbeitet.

Beispiel 2 (Abb. 6): Enzymtest mit modifizierten Testbedingungen (Tab. 3). Der Gradient verlief von 13 - 38 % und wurde 3 h x 80000 $g_{av}$ zentrifugiert. Die Verteilung der GT IG ist trotz kürzerer Laufzeit gleich wie im ersten Beispiel. Das Maximum liegt bei 30 % Saccharose. Etwas verändert sieht es bei GT IU aus. Der zweite Gipfel liegt wieder bei 30 %, der erste aber bereits bei 15,5 % Saccharose. Das Maximum der GT IsU, gemessen mit den optimierten Testbedingungen (40 $^{o}C$, 1 mM $ZnCl_2$), findet man ebenfalls bei 13 - 15 % Saccharose. Auch in den Fraktionen kurz vor Beginn des Gradienten ist dieses Enzym vorhanden. Im Gradient selbst ist es nicht mehr nachweisbar, auch nicht in den Gipfelfraktionen der GT IU und GT IG.

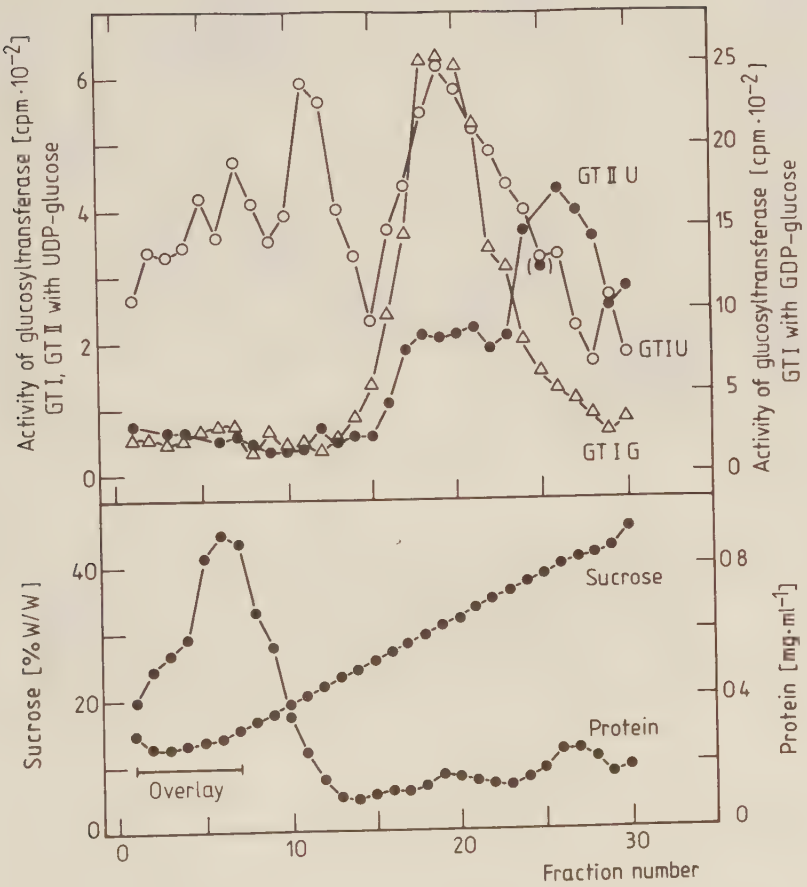


Abb. 5: Verteilung der Glucosyltransferasen in einem linearen Saccharose-Gradienten von 15 - 45 % (w/w). Laufzeit: 15 h bei 80000$g_{av}$; Zellen $DC_b$ (186), 5d; Fraktionen à 1,3 ml; Testdurchführung nach dem Ausgangsschema (Tab. 2).

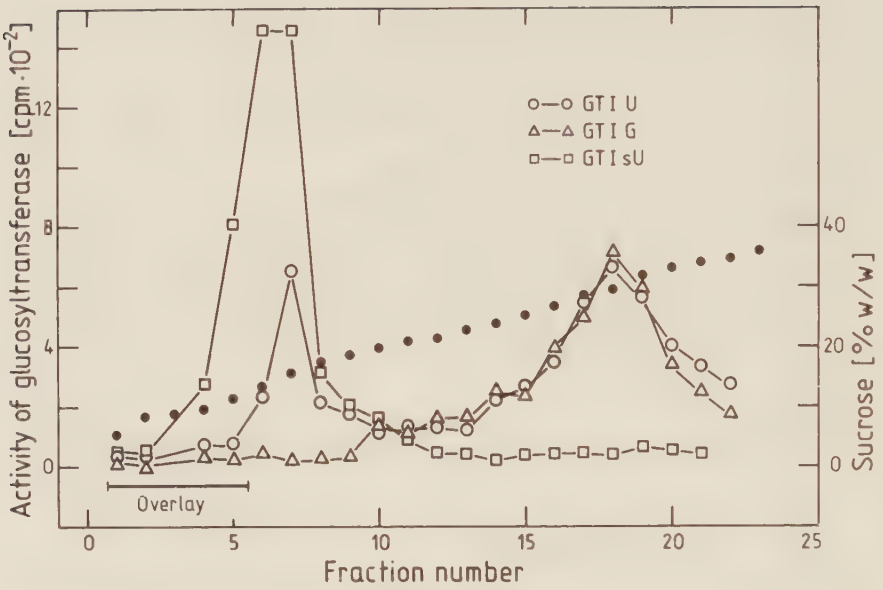


Abb. 6: Verteilung der Glucosyltransferasen in einem linearen Saccharose-Gradienten von 13 - 38 % (w/w) mit einem Kissen von 45 % (2 ml). Laufzeit: 3 h bei 80000$g_{av}$; Zellen: $DC_b$ (234), 5d; Fraktionen à 1,5 ml. Die Enzyme wurden nach den modifizierten Bedingungen (Tab. 3) getestet. Zur Messung von GT IU und GT IsU wurde die doppelte Menge an markiertem Substrat eingesetzt (2 µM).

Beispiel 3 (Abb. 7): Enzymtest mit modifizierten Testbedingungen (Tab. 3). Der Gradient erstreckte sich von 13 - 38 % Saccharose mit einem Kissen von 50 %. Die Laufzeit betrug 15 h bei 80000 $g_{av}$. Alle vier Enzyme sind mit sehr deutlichen Gipfelfraktionen vertreten. Das einzige Maximum der GT IG liegt wiederum bei 30 % Saccharose. Hier zeigt auch die GT IU ihre höchsten Werte. Aber auch bei 20 % Saccharose findet man eine erhöhte Enzymaktivität mit dem Testansatz GT IU. Dieser zweite Gipfel läuft exakt parallel der Enzymaktivität gemessen mit dem Testansatz der GT IsU. In diesem Fall fehlt diese Enzymaktivität in den "overlay"-Fraktionen ebenso wie im weiteren Verlauf des Gradienten. Die GT IIU lief auf das Kissen auf und hat ihr Maximum bei 39,5 % Saccharose. Auch diesmal gibt es einen Zwischengipfel um 30 % Saccharose, der aber nicht so prägnant ausfällt wie im Gradient Abb. 5.

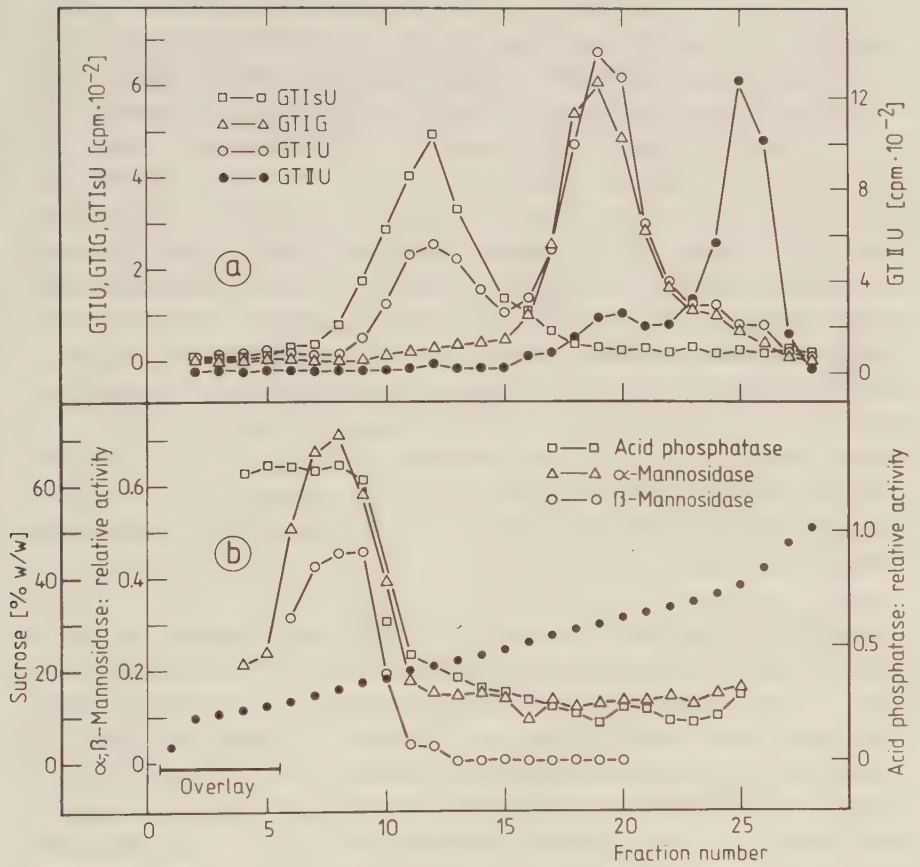


Abb. 7: Verteilung der Glucosyltransferasen und möglichen Vakuolen-Markerenzymen in einem linearen Saccharose-Gradienten von 13 - 38 % (w/w) mit einem Kissen von 50 % (1,5 ml). Laufzeit: 15 h bei 80000$g_{av}$; Zellen: $DC_b$ (235), 5d; Fraktionen à 1,4 ml. (a) Glucosyltransferasen nach dem modifizierten Testsystem (Tab. 3). UDP-$^{14}$C-Glucose wurde doppelt konzentriert eingesetzt (2 µM). Bei GT IIU war zusätzlich Cellobiose 50 mM im Testansatz enthalten. (b) Saure Phosphatase, α-Mannosidase, β-Mannosidase. Gemessen würde $\Delta E_{405}$ nach Punkt 4 im Methodenteil).

2.2.2. Leitenzyme

Zur Identifizierung der Membranen, die sich in den unterschiedlichen Dichtebereichen ansammeln, wurden beim Gradienten aus Abb. 7 mögliche Leitenzyme für Vakuolen/Tonoplast gemessen. Dadurch sollte geklärt werden, ob es sich bei dem Material bei 20 % Saccharose um Membranen und Vesikel handelt, die von der Vakuole abstammen. Die saure Phosphatase (LEIGH und WALKER, 1980) wie auch die α-Mannosidase (BOLLER und KENDE, 1979; GLUND et al., 1984) gelten als Leitenzyme für dieses Organell. Sie sollen sich gelöst in der Vakuole befinden. Die ß-Mannosidase wurde als mögliches Leitenzym in Betracht gezogen, welches am Tonoplast gebunden oder vielleicht sogar in die Membran integriert sein soll (GROSS, 1982; HOPP et al., 1985). Alle drei Enzyme waren in Gradientenfraktionen meßbar. Die saure Phosphatase besaß hohe Aktivität im "overlay" bis hin zu 17 % Saccharose. Die beiden Mannosidasen stiegen von niedrigerem Niveau zu Beginn des Gradient an und hatten ihr Maximum bei 16 bzw. 17 % Saccharose. Alle drei Enzyme belegten, daß die Fraktion bei 20 % Saccharose kein oder nur wenig Vakuolenmaterial enthielt.

Für Vakuolenmembranen werden in der Literatur Dichten angegeben von 1,08 - 1,10 $g.cm^{-3}$ (Übersicht bei QUAIL, 1979; ROBINSON, 1985), dies entspricht 20 - 24 % w/w Saccharose. Die Vakuolen-Markerenzyme in diesem Gradienten liegen aber bei einer Dichte von 1,065 $g.cm^{-3}$. Ein wichtiger Aspekt ist auch die Tatsache, daß die GT IsU-Aktivität offensichtlich langsam in den Gradienten hineinwandert (Vergleiche 3 h und 15 h Lauf in Abb. 6 und 7), wohingegen die anderen Glucosyltransferasen bereits nach 3 h ihre endgültige Lage erreicht haben. Beim Gradienten aus Abb. 6 lagen die Hauptaktivitäten von ß-Mannosidase und GT IsU am Beginn des Gradienten (15 %). Bei längerer Laufzeit (Abb. 7) wandert die GT IsU bis 20 % die ß-Mannosidase, verbleibt aber bei 16 - 17 % Saccharose. Dieses Verhalten wurde als Kriterium für gelöste Proteine herangezogen, die in den Gradienten hineinwandern (NAGAHASHI und BAKER, 1984). Diese Autoren zeigten, daß eine ß-Glucosidase aus Zea mays, von der man annahm, daß sie mit dem Tonoplast assoziiert sei (1,09 $g.cm^{-3}$), in Wirklichkeit ein lösliches Enzym ist, welches in den Gradienten hineinwandert. Einen weiteren Hinweis, daß es sich bei der GT IsU nicht um ein Vakuolen-assoziiertes Enzym handelt, brachten Versuche mit gereinigten Vakuolen, die von meinem Kollegen W. Hopp zur Verfügung gestellt wurden. Die Vakuolenpräparation wurde nach HOPP et al. (1985) durchgeführt. In diesen Präparationen konnte keine der Glucosyltransferasen signifikant nachgewiesen werden.

Zur Identifizierung von Golgi- und Plasmamembranen werden oft die latente IDPase (RAY et al., 1969; QUAIL, 1979) bzw. eine $K^+$-stimulierbare saure ATPase (HODGES und LEONARD, 1974; CROSS und BRIGGS, 1976) herangezogen. Die Aktivität der latenten IDPase wurde nach RAY et al. (1969), die der $K^+$-stimulierbaren, sauren ATPase nach LIN und MORALES (1977) bestimmt.

Bei verschiedenen Versuchen lag das Maximum der latenten IDPase (33 %) im Bereich der höchsten Aktivität von GT IU und GT IG. Die $K^+$-ATPase lag mit ihrem Gipfel bei höheren Dichten (38 %) bei der GT IIU. Die Gipfelfraktionen der Glucosyltransferasen und Nukleotidasen lagen aber immer versetzt nebeneinander. Auch zeigten die beiden Enzyme eine sehr breite Verteilung. Die beiden Glucosyltransferasen GT IU und GT IIU wurden ebenfalls als Leitenzyme für Golgi- bzw. Plasmamembran genannt (RAY, 1979; QUAIL, 1979).

Eine Übereinstimmung in der Lage der Gipfelfraktionen war zwar nicht gegeben, dennoch können die Membranen in den entsprechenden Dichtebereichen als Golgimembran (um 30 %) bzw. Plasmamembran (um 40 %) angesprochen werden. Dies wird auch durch den Vergleich der in der Literatur angegebenen Dichten für diese beiden Membranen gestützt. Frühere Versuche (INGOLD, 1982) bestätigen diese Ergebnisse. Die Aktivität der NADH-Cytochrom C-Reduktase, ein Leitenzym für ER-Membranen (gemessen nach HODGES und LEONARD, 1974), zeigte bei diesen Bedingungen eine breite Verteilung über den ganzen Gradienten mit zunehmender Aktivität und Höchstwerten bei 38 % Saccharose. Der gleiche Verlauf der CCR wurde von WIENECKE et al. (1982) beschrieben bei Verwendung von Karottenzellen als Ausgangsmaterial und $MgCl_2$-haltigem Puffer. In Puffer, die EDTA enthalten, d. h. $MgCl_2$-arm bis -frei sind, lag dagegen das sehr deutliche Maximum der CCR bei 23 % Saccharose (WIENECKE et al., 1982).

### 2.2.3. Anreicherung der Glucosyltransferasen

In Tab. 8 sind die spezifischen Aktivitäten der Glucosyltransferasen aufgelistet. Da die Durchführung der Enzymmessung variierte (Ausgangsschema, modifizierter Test und doppelter Substrateinsatz im modifizierten Test), werden die unteren und oberen Werte aller Daten angegeben.

Tab. 8: Spezifische Aktivitäten (pMole eingebaute Glucose. $min^{-1}.mg^{-1}$ Protein) in Rohhomogenaten und in den Gipfelfraktionen linearer Gradienten (Laufzeit 15 h)

| Fraktionen (% Saccharose w/w) | GT IU | GT IG | GT IIU | GT IsU |
|---|---|---|---|---|
| Rohhomogenat | 0,9 - 1,8 | 30 - 50 | 800 - 1800 | 0,5 - 1 |
| 20 | 17 - 24 | - | - | 20 - 45 |
| 30 | 40 - 70 | 350 - 880 | - | - |
| 39 | - | - | 3000 - 5200 | - |

Es ergaben sich durch Trennung im linearen Gradienten beträchtliche Erhöhungen in der spezifischen Aktivität gegenüber dem Rohhomogenat (GT IU bei 20 % 10 bis 20fach; GT IU bei 30 % ca. 40fach; GT IG bei 30 % ca. 10 bis 20fach; GT IIU bei 39 % 3 bis 6fach und GT IsU bei 20 % etwa 20fach), wobei bei Verwendung der modifizierten Testbedingungen die Glucosyltransferasen GT IsU (20 %), GT IU und GT IG (30 %) sowie GT IIU (40 %) nur geringfügig überlappten. Die Glucosyltransferase GT IsU wurde noch weiter gereinigt (siehe dazu Punkt III.6.5.).

2.3. Orientierung der Membranen nach der Homogenisation

Es ist bekannt, daß Membranen nach dem Aufschluß der Zellen geschlossene Vesikel ausbilden. Die Orientierung der Membranen der Vesikel kann "outside out" und/oder "outside in" sein. Vor allem bei Plasmamembranen wäre es denkbar, daß beide Möglichkeiten auftreten (ROBINSON und QUADER, 1981). Die Glucosyltransferasen, die in den Membranen integriert sind, wären demzufolge je nach Vesikelschluß in unterschiedlicher Weise orientiert. Dies kann dazu führen, daß die Substrate, die im Puffer angeboten werden, nicht allen Enzymmolekülen zugänglich sind, es sei denn, es gibt einen Transportmechanismus für das betreffende Substrat durch die Membran. Ein solches Transportsystem für GDP-Mannose wurde von HASELBECK und TANNER (1982) beschrieben.

Tab. 9: Wirkung der Effektoren auf die Enzymaktivitäten. Änderung in %, bezogen auf die Kontrolle bei gleichen Verdünnungsstufen.
a) Wirkung von Trypsin
b) Wirkung von Digitonin und Filipin auf unbehandelte Membranen
c) Wirkung von Digitonin und Filipin auf Trypsin-behandelte Membranen
Die Membranen (2,6 mg.ml$^{-1}$.Protein) wurden inkubiert mit: Trypsin: Endkonzentration 1 mg.ml$^{-1}$, 10 min, Raumtemperatur, danach zweimal gewaschen, 60 min, 31000g; Digitonin: Endkonzentration 5 und 0,25 mg.ml$^{-1}$, 10 min, 20 °C; Filipin: Endkonzentration 0,1 und 0,2 mg.ml$^{-1}$, 10 min, 20 °C. Die Enzyme wurden in Anwesenheit der Wirkstoffe nach Tab. 3 gemessen.

| Ansätze | GT IG | | GT IIU | | GT IsU | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | cpm | % | cpm | % | cpm | % |
| a) | | | | | | |
| Kontrolle | | | | | | |
| Puffer 10 min, 4 °C | 5100 | 100 | 615 | 100 | 525 | 100 |
| Trypsin | | | | | | |
| 10 min, 20 °C | 33 | 0,6 | 88 | 14 | 298 | 56 |
| b) | | | | | | |
| Kontrolle | | | | | | |
| Puffer 10 min, 20 °C | 1710 | 100 | 187 | 100 | 326 | 100 |
| Digitonin 0,25 mg | 1530 | 90 | 3655 | 1954 | 265 | 81 |
| 5 mg | 1560 | 91 | 3782 | 2024 | 331 | 101 |
| Filipin 0,1 mg | 1278 | 75 | 578 | 309 | 296 | 91 |
| 0,2 mg | 1231 | 72 | 971 | 519 | 359 | 110 |
| c)[x] | | | | | | |
| Kontrolle | | | | | | |
| Trypsin 10 min, 20 °C | 20 | - | 47 | - | 88 | - |
| Digitonin 0,25 mg | 7 | - | 109 | - | 131 | - |
| 5 mg | 13 | - | 419 | - | 217 | - |
| Filipin 0,1 mg | 14 | - | 84 | - | 97 | - |
| 0,2 mg | 9 | - | 167 | - | 107 | - |

[x] Auf eine Angabe in % der Kontrolle wird verzichtet, da die Kontrollwerte sehr gering sind.

Frisch aufgearbeitete Membranfraktionen (30 K Sediment) von 6 Tage alten Zellen wurden mit Trypsin, Digitonin und Filipin behandelt. Folgende Fragen sollten beantwortet werden: Werden die Glucosyltransferasen durch den Vesikelschluß gegen Inaktivierung durch Trypsin geschützt? Läßt sich der Glucoseeinbau durch Digitonin und Filipin in unbehandelten und in Trpysin-behandelten Proben erhöhen? Digitonin steigert die GT IU und GT IIU bei einem gewissen Detergens-Membranverhältnis möglicherweise dadurch, daß die Membran für das Substrat durchlässig wird. Filipin soll ebenfalls die Permeabilität von Membranen beeinflussen (siehe Punkt III.11.4.).

Durch Inkubation der Membranen mit Trypsin für 10 min bei Raumtemperatur sank der meßbare Proteinanteil um 50 %.

Alle drei Enzyme wurden durch Trypsin gehemmt. Entweder liegen die Enzyme oder zumindestens Teile davon an der Trypsin zugekehrten Seite, oder die Glucosyltransferasen wurden durch die Zerstörung anderer Membran-Proteine und die damit verbundene Änderung der Membraneigenschaften inhibiert. Nur die GT IIU wurde durch Filipin und vor allem Digitonin aktiviert. GT IG und GT IsU blieben dagegen unbeeinflußt bis leicht gehemmt. In einem dritten Ansatz sank der Glucoseeinbau aller drei Enzyme auf Grund der Trypsin-Einwirkung unter 100 cpm ab. Durch Einwirkung von Filipin und Digitonin erhöhte sich der Einbau bei GT IsU und GT IIU. Zuvor nicht aktives Enzym wurde durch Einwirkung dieser Effektoren aktiv.

3. Charakterisierung der Glucosyltransferasen

Die Testbedingungen bei den Charakterisierungsversuchen waren in der Regel wie folgt: Reaktionsgemisch nach Tab. 3.

GT IU: 14 K Sediment, 25 $^{o}$C, 3 min
GT IG: 14 K Sediment, 25 $^{o}$C, 30 sec
GT IIU: 14 K Sediment, 25 $^{o}$C, 5 min
GT IsU: Ammoniumsulfat-gefälltes Protein (siehe III.6.1.), 40 $^{o}$C, 3 min

Ansätze mit millimolaren Konzentrationen an GDP-Glucose (GT IIG) zeigten in keinem der untersuchten Fälle(verschiedene Fraktionen, mit und ohne $MgCl_2$) einen Einbau von Glucose.

Die Bezeichnungen GT IU u.s.w. sind zunächst nicht als Benennung bekannter Enzyme zu werten, sondern als Enzymaktivitäten, die in diesen Testansätzen Zucker in Ethanol-unlösliches Material einbauen. Abweichungen sowie Proteinkonzentrationen im Test (in µg) werden in den Legenden der Schaubilder aufgeführt.

3.1. Temperaturabhängigkeit

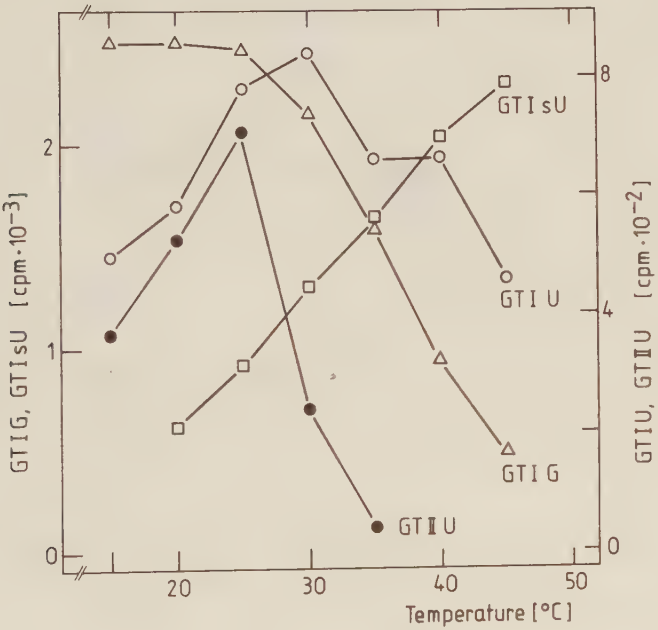


Abb. 8: Temperaturabhängigkeit der verschiedenen Glucosyltransferasen. GT IIU wurde aus dem Rohhomogenat gemessen. Testbedingungen nach Tab. 2.

Verschiedene Optimumstemperaturen können für die Enzyme angegeben werden. Die Testtemperatur wurde für alle anderen Versuche auf 25 °C festgelegt. Hier arbeiten GT IG und GT IIU optimal. Bei GT IU ist das Optimum etwas zu höheren Temperaturen verschoben (30 °C). Dies könnte damit zusammenhängen, daß unter den Testbedingungen dieses Ansatzes auch GT IsU arbeitet. Diese

lösliche Glucosyltransferase zeigt eine völlig andere Temperaturabhängigkeit. Ihre Aktivität steigt bis über 40 °C stetig an. Erst bei höheren Temperaturen > 60 °C nimmt ihre Aktivität wieder ab. Hitzedenaturiertes Protein (100 °C, 1 min) zeigt keine Enzymaktivität.

3.2. Abhängigkeit vom pH

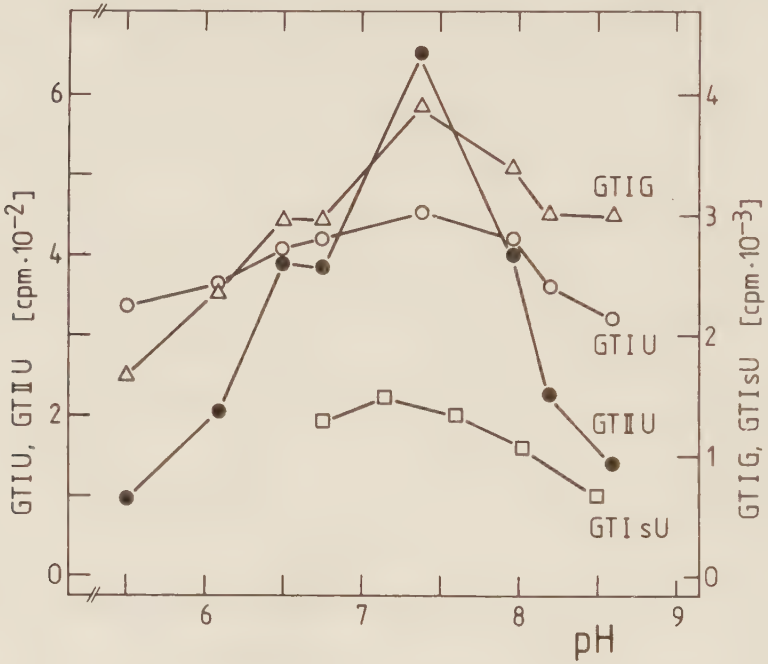


Abb. 9: pH-Abhängigkeit der Glucosyltransferasen. Die Reaktionsgemische waren in aqua bidest. angesetzt. GT IU, IG und IIU mit 42 µg Protein, GT IsU mit 20 µg. Die Testzeit bei GT IG war 1 min. Zur Durchführung des Versuchs siehe Punkt II.9.1.

Für alle membranintegralen Enzyme GT IU, GT IG, GT IIU liegt die höchste Enzymaktivität bei pH 7,5. Unterschiedlich ist allerdings die Steilheit des Anstieges bzw. Abfalls der Kurven. Den ausgeprägtesten Kurvenverlauf zeigt die GT IIU. Bei diesem Enzym sind nur 15 bzw. 20 % der Maximalaktivität bei pH 5,5 bzw.8,6 meßbar. Schon flacher verläuft die Kurve von GT IG (44 % - 100 % - 76 %), und bei GT IU liegt der Maximalwert nur 20 % höher als bei pH 5,5 und 30 % höher als bei pH 8,6. Das Optimum der GT IsU liegt zwischen

pH 7 und 7,5. Durch Mischung der Enzymlösungen (pH 7,1 - 7,2) mit Testpuffer (pH 8,0) stellt sich ein pH von ca. 7,5 ein (siehe Abb. 2d). Die Enzyme werden somit in ihrem pH-Optimum gemessen. Bei der Interpretation ist zu berücksichtigen, daß sich pH-Effekte auch über den Einfluß auf die Membranen oder/und die Substrate manifestieren können.

### 3.3. Zeitabhängigkeit

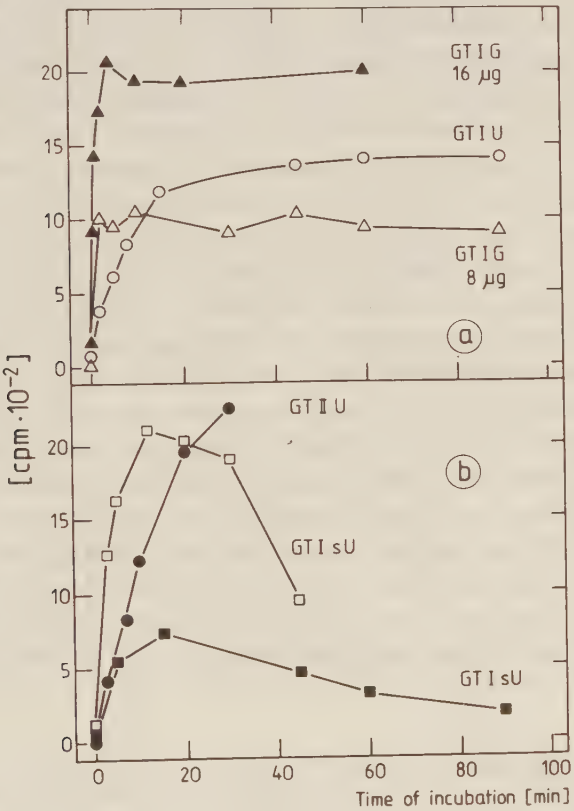


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der Glucosyltransferase-Aktivitäten. Die Enzymaktivitäten wurden mit dem Ausgangs-Testansatz (Tab. 2) gemessen: (a) GT IU und GT IG mit einer 14000g Sedimentfraktion. GT IG wurde mit verschiedenen Proteinkonzentrationen gemessen. (b) GT IIU mit einer Gesamtmembranfraktion (1,2 K - 175 K x g), GT IsU mit A.sulfatgefälltem Protein. Der Einbau von Glucose wurde bei GT IsU direkt aus dem gewaschenen Produkt □ - □ (A.sulfat 0 - 50 %, 60 µg Protein; siehe II.8.3.2.) oder aus der am Start verbliebenen Radioaktivität nach PC des Testansatzes bestimmt (A.sulfat 0 - 36 %, 65 µg Protein; siehe II.8.3.4.).

Alle Enzyme gehen nach bestimmten Testzeiten in Sättigung. Die Reaktion läuft bei GT IIU mit 76 µg Protein im Test 10 - 15 min linear. Dies entspricht ca. 2000 cpm (5 % der eingesetzten cpm). GT IU (60 µg) geht zwischen 10 und 20 min in Sättigung. Die Reaktion verläuft aber auch in den ersten 10 min nicht streng linear. Die Substratkonzentration liegt in diesem Testansatz weit unter der apparenten $K_m$ des Enzyms, was zu einer kontinuierlichen Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit führt (siehe III.3.8.2.). Die Inkubationszeit wurde für dieses Enzym auf maximal 5 min (1,2 % der angebotenen cpm werden eingebaut) begrenzt. Einen völlig anderen Kurvenverlauf findet man bei GT IG. Der Einbau in den ersten 1 - 2 min verläuft linear. Danach knickt die Kurve plötzlich ab, und keine weitere Glucose wird eingebaut. Die eingesetzte Proteinmenge bestimmt das Niveau des Sättigungsbereichs (Abb. 10a). Der doppelte Einsatz an Protein ergibt den zweifachen Wert an eingebauter Glucose, dabei werden bis zu 25 % der angebotenen radioaktiv markierten Glucose umgesetzt. Es sieht so aus, als ob nach sehr kurzer Zeit die Reaktion abbricht, weil ein Faktor ins Minimum gerät. Dieser Punkt spielt in anderem Zusammenhang noch eine wichtige Rolle und wird später wieder aufgegriffen werden (siehe III.7.). Auch die Zeitabhängigkeit der GT IsU zeigt eine Besonderheit (Abb. 10b). Radioaktivität, die zuvor in Ethanol-unlösliches Material eingebaut wurde, wurde bei längeren Inkubationszeiten wieder Ethanol-löslich. Dieses Ergebnis erhielt man mit zwei verschiedenen Methoden. Sowohl bei der Waschung der Produkte in 70 % Ethanol und dirkter Zählung in Szintillationsflüssigkeit oder nach PC der gewaschenen Produkte, als auch bei direkter PC des gesamten Testansatzes zeigte sich, daß die Produkte nach 10 min stabiler sind als nach 30 min (oder länger) Inkubation. Auch dieser Punkt wird später noch einmal aufgegriffen werden (siehe III.6.2.).

### 3.4. Proteinabhängigkeit

Mit zunehmender Proteinkonzentration bauen alle vier Enzyme bei konstanter Testzeit kontinuierlich mehr Substrat ein. Dies geht so lange, bis das Substrat nicht mehr ausreichend vorhanden ist und die Kurve abknickt. Bis zu welcher Proteinkonzentration der Einbau linear verläuft, hängt von der Enzymquelle und deren Reinigungsstufe ab. In den Testansätzen wurde darauf geachtet, daß so wenig Protein wie möglich eingesetzt wurde.

### 3.5. Gefriertrocknung der Enzyme

In der Literatur wird immer wieder auf die Labilität von Glucansynthetasen speziell der Cellulose-synthetisierenden Enzymaktivität hingewiesen. Alle vier Enzymaktivitäten sind aus gefrorenen Zellen isolierbar. Die Aktivität ist auch noch vorhanden, wenn man die isolierten Membranfraktionen oder mit Ammoniumsulfat gefällte Fraktionen bei -70 $^{o}$C einfriert und nach längerer Lagerung (Wochen bis Monate) mißt. Proben mit hohem Proteingehalt scheinen dabei stabiler zu sein als stark verdünnte. In Tab. 10 werden die spezifischen Enzymaktivitäten aus frisch aufgearbeiteten Proben (14 K Sediment und Ammoniumsulfat-Fraktion), denen gegenübergestellt, die man aus lyophilisierten und danach resuspendierten Enzymproben erhält.

Tab. 10: Lyophilisierbarkeit der Glucosyltransferasen. Enzymaktivität in (pMole.min$^{-1}$.mg$^{-1}$ Protein)

| Enzym | Quelle | Membranen in Puffer | Membranen lyophilisiert u. resuspendiert |
|---|---|---|---|
| GT IU | 14 K Sediment | 4,4 | 4,2 |
| GT IG | 14 K Sediment | 212 | 204 |
| GT IIU | 14 K Sediment | 4533 | 4330 |
| GT IsU | A.sulfat-gefällt | 29,8 | 12 |
| GT IG mit GDP-Man | 14 K Sediment | 21,6 | 39,8 |

Innerhalb gewisser Schwankungen bleiben die Enzyme aktiv. Auch die membranintegralen Enzyme verlieren ihre Aktivität nicht. Eine Vorinkubation bei 25 $^{o}$C für 60 min beeinflußt die Aktivität der GT IU und GT IIU (aus dem 100 K Sediment) sowie der GT IsU (aus dem 100 K Überstand) nur geringfügig.

### 3.6. Einfluß von Ionen auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten

Die Reaktionsgemische wurden ohne Ionen angesetzt. Die gewünschte Ionenart und -konzentration wurde im Test eingestellt.

3.6.1. Konzentrationsabhängigkeit von verschiedenen Salzen

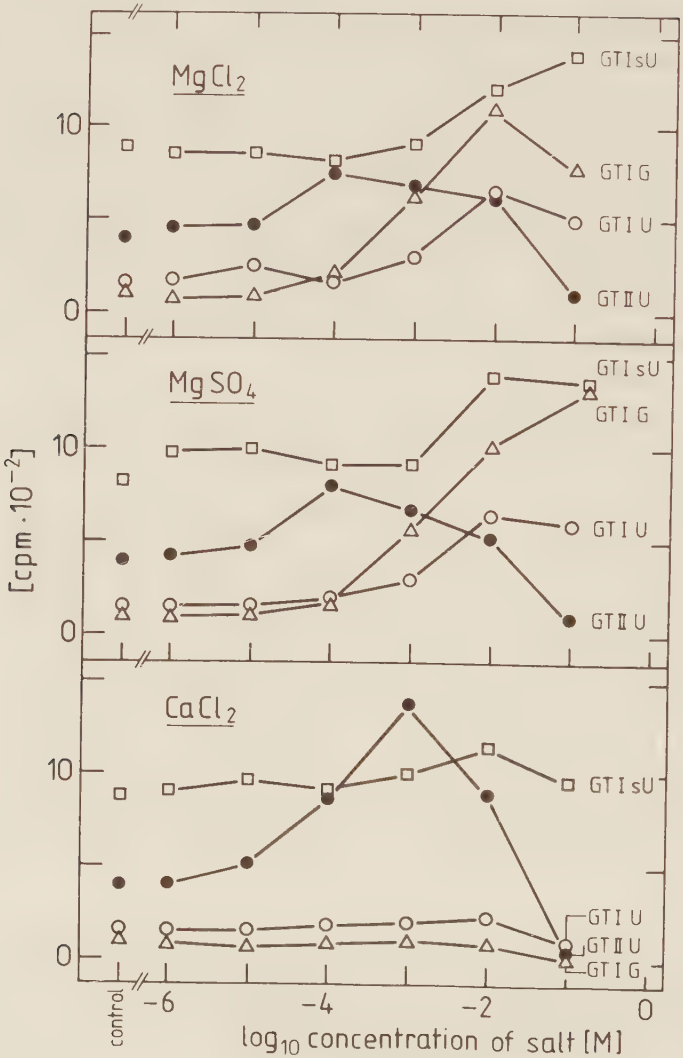


Abb. 11: Einfluß verschiedener Ionen auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten. Die Reaktionsgemische wurden nach Tab. 3 ohne Ionen angesetzt. Die Konzentrationen im Test wurden durch Zugabe (10 µl) der Salzlösungen in den Testansatz eingestellt. Protein im Test: GT IU (67 µg), GT IG (18 µg), GT IIU (31 µg), GT IsU (43 µg).

Abb. 11a: Einfluß von $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$

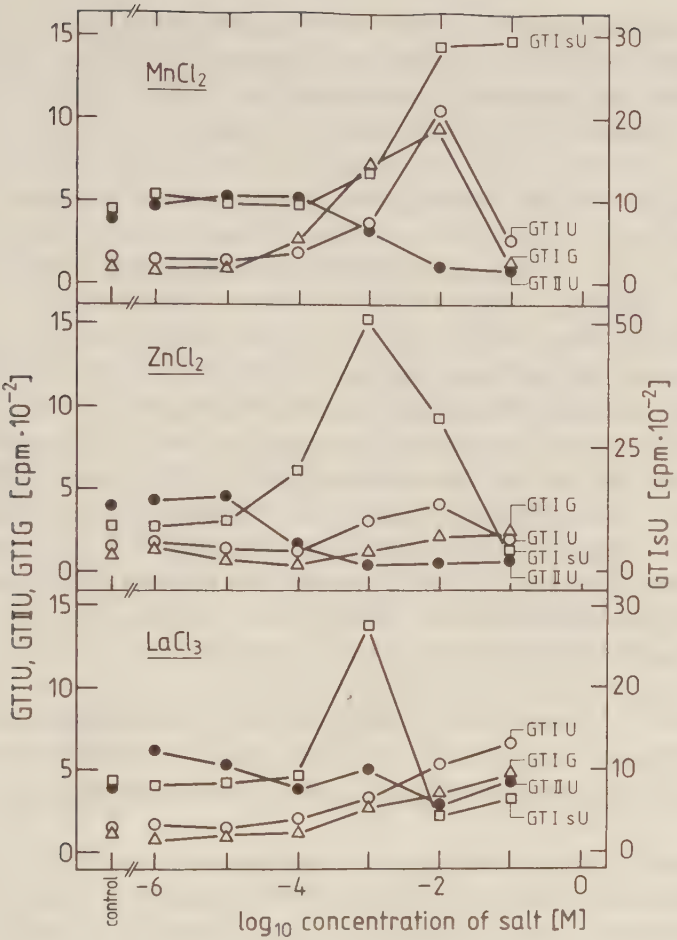


Abb. 11b: Einfluß von $MnCl_2$, $ZnCl_2$, $LaCl_3$

Auf die Abhängigkeit der Glucansynthasen von zweiwertigen Kationen wurde von verschiedenen Autoren hingewiesen (RAY, 1979; CARPITA und DELMER, 1980; HENRY und STONE, 1982a). Vor allem zweiwertige Kationen spielen eine wichtige Rolle. Der Einfluß von $MgCl_2$, $MgSO_4$, $CaCl_2$, $MnCl_2$, $ZnCl_2$ und KCl als Vergleich für ein einwertiges Kation auf die Enzymaktivitäten wurde in Abhängigkeit der Salzkonzentration untersucht. Als weiteres Salz wurde $LaCl_3$ hinzugenommen. Es wurde berichtet, daß $La^{3+}$ die in vivo-Wirkung von

$Ca^{2+}$ verstärken und $Ca^{2+}$ sogar ersetzen kann (TAKATA et al., 1966). Es wurde gezeigt, daß $La^{3+}$ nicht in die Pflanzenzelle eindringt, sondern als Calciumantagonist im extracellulären Raum wirkt (SAUNDERS und HEPLER, 1983) und $Ca^{2+}$-Bindungsstellen in der Plasmamembran besetzt.

Die Glucosyltransferasen können in zwei Gruppen aufgeteilt werden:

GT IU und GT IG: Sie sind ohne die Zugabe von Ionen im Test inaktiv. Auch in ihrer Reaktion auf unterschiedliche Ioneneinflüsse sind sich GT IU und GT IG ähnlich. Beide werden durch $MgCl_2$ und $MgSO_4$ in gleichem Maße aktiviert. Bei höheren Konzentrationen (100 mM) ist mit $MgCl_2$ eine Hemmung zu beobachten, die mit $MgSO_4$ nicht auftritt und auf das $Cl^-$-Anion zurückzuführen ist. Ebenfalls zu einer Aktivierung führt $MnCl_2$. Das Optimum liegt bei 10 mM und bei 100 mM sind beide Enzymaktivitäten wieder inaktiv. In diesem Fall ist die fördernde Wirkung auf GT IU größer als auf GT IG. $ZnCl_2$ aktiviert GT IU schwach mit einem Optimum bei 10 mM. GT IG zeigt keine signifikante Reaktion. Mit $LaCl_3$ steigen beide Enzymaktivitäten ab 0,1 mM langsam bis zu 100 mM an. GT IU reagiert wiederum besser auf $LaCl_3$ als GT IG. Inaktiv bleiben beide Enzyme mit $CaCl_2$ und KCl.

$Mg^{2+}$ oder $Mn^{2+}$ sind für diese beiden Enzymaktivitäten essentiell. Bei hohen Konzentrationen kann das Anion $Cl^-$ einen negativen Gegeneinfluß ausüben. Die Wirkungen von $Zn^{2+}$ und $La^{3+}$ sind im Vergleich viel geringer.

GT IsU und GT IIU: Sie bauen auch ohne exogene Zugabe von Ionen Glucose in Ethanol-unlösliches Produkt ein. Diese beiden Enzyme sind sich in ihrer Reaktion auf die Ionen weniger ähnlich. GT IIU erfährt durch $Mg^{2+}$ (0,1 mM) eine Aktivitätszunahme um 80 - 100 %. Bei höheren Konzentrationen fällt die Enzymaktivität wieder ab bis auf 0 bei 100 mM. Auch bei $Mn^{2+}$, $Zn^{2+}$ und $La^{3+}$ ist bei niedrigen Konzentrationen eine leichte Steigerung vorhanden (25 %, 10 %, 52 %). Mit $Ca^{2+}$ (1 mM) erfährt die GT IIU eine Steigerung um 237 %. Bei höheren Konzentrationen (100 mM) tritt auch hier eine vollständige Hemmung ein. Die GT IIU wird mit Ausnahme von KCl und $LaCl_3$ von allen Salzen bei hohen Konzentrationen vollständig gehemmt. Mit $La^{3+}$ schwankt die Aktivität bis in hohe Konzentrationen um den Kontrollwert. KCl bewirkt eine langsam zunehmende Hemmung. Bei 240 mM sind noch 30 % des Wertes ohne Salz meßbar.

Die GT IsU wird durch $Mg^{2+}$ und $Ca^{2+}$ bei hohen Konzentrationen (10, 100 mM) um 56 bzw. 29 % gesteigert. Mit $Mn^{2+}$ (100 mM) liegt die Förderung bei 238 %. Mit $Zn^{2+}$ und $La^{3+}$ zeigt das Enzym ein Optimumsverhalten. Bei 1 mM beträgt die Steigerung durch $La^{3+}$ 208 % und durch $Zn^{2+}$ 475 %. Bei hohen Konzentrationen sinkt die Enzymaktivität unter den Kontrollwert. KCl zeigt bis 240 mM keinen Einfluß auf die Aktivität der GT IsU. $Zn^{2+}$ scheint für die Aktivität dieses Enzyms ein wichtiger Faktor zu sein. Auch $Mn^{2+}$ und $La^{3+}$ bewirken eine starke Erhöhung des Glucoseeinbaus,

Die Wirkung der Ionen kann unterschiedliche Ursachen haben. Einflüsse der Ionenstärke auf die Löslichkeit von Proteinen ("salting in - salting out") macht man sich z. B. bei der Isolierung durch Salz-Fraktionierung (Ammoniumsultat-Fällung) zu Nutze. Die Alkoholdehydrogenase ($Zn^{2+}$), Phosphohydrolasen ($Mg^{2+}$), die Arginase ($Mn^{2+}$) sowie die Tyrosinase ($Cu^{2+}$) sind einige Beispiele für Enzyme, die Metallionen als Cofaktoren benötigen (LEHNINGER, 1975), und letztlich sei der stabilisierende Einfluß von Ionen auf große Partikelkomplexe im Plasmalemma erwähnt (MONTEZINOS und BROWN, 1979). Eine Wirkung über das Substrat ist zwar denkbar, bei den vorliegenden Ergebnissen aber wenig wahrscheinlich. Bis auf GT IG arbeiten alle Enzyme mit dem gleichen Substrat. Die optimale Wirkung wird aber durch verschiedene Ionen erzeugt: $Mg^{2+}$ bei GT IU, $Ca^{2+}$ bei GT IIU und $Zn^{2+}$ bei GT IsU.

### 3.6.2. Einfluß kombinierter Salzmischungen auf die Enzymaktivitäten

In III.3.6.1. wurde der Einfluß verschiedener Ionen auf die Enzymaktivitäten aufgezeigt. Es stellte sich heraus, daß die Aktivität der Enzyme durch verschiedene Ionen erhöht werden kann. In diesem Versuch wurde überprüft, ob sich die Enzymaktivitäten durch den kombinierten Einsatz zweier verschiedener Ionen noch erhöhen läßt. Dazu wurden für jedes Enzym die beiden Ionen kombiniert, die einzeln die beste Förderung zeigten. Die gewählten Konzentrationen entsprachen den Optimumswerten aus Abb. 11.

Die Kombination zweier Ionen, die, wenn sie alleine eingesetzt werden, die Enzymaktivitäten fördern, brachte in keinem Fall eine zusätzliche Steigerung. Es wurde sogar in allen Fällen, verglichen mit dem Optimumswert, eine leichte Abschwächung registriert. Die meisten Autoren setzen in ihrem Glucansynthase-Testsystem $MgCl_2$ ein (WALTON und RAY, 1982; HENRY und STONE, 1982a; ALONI et al., 1982). Nur selten werden andere zweiwertige Ionen verwendet, z. B. $Mn^{2+}$ in einem UDP-Glucose-Protein-Transglucosylase-System

(LAVINTMAN et al., 1974). Die Ergebnisse hier zeigen, daß man durch die gezielte Wahl bestimmter Ionen Testbedingungen erhält, in denen einzelne Enzyme sehr stark aktiviert werden. Ein zusätzlicher Vorteil ergibt sich dadurch, daß die anderen Enzyme bei diesen Bedingungen sehr schlecht arbeiten und teilweise sogar noch gehemmt werden. Die Möglichkeit, einzelne Enzyme aus Gesamtproteinfraktionen selektiv zu messen, ist somit wesentlich verbessert.

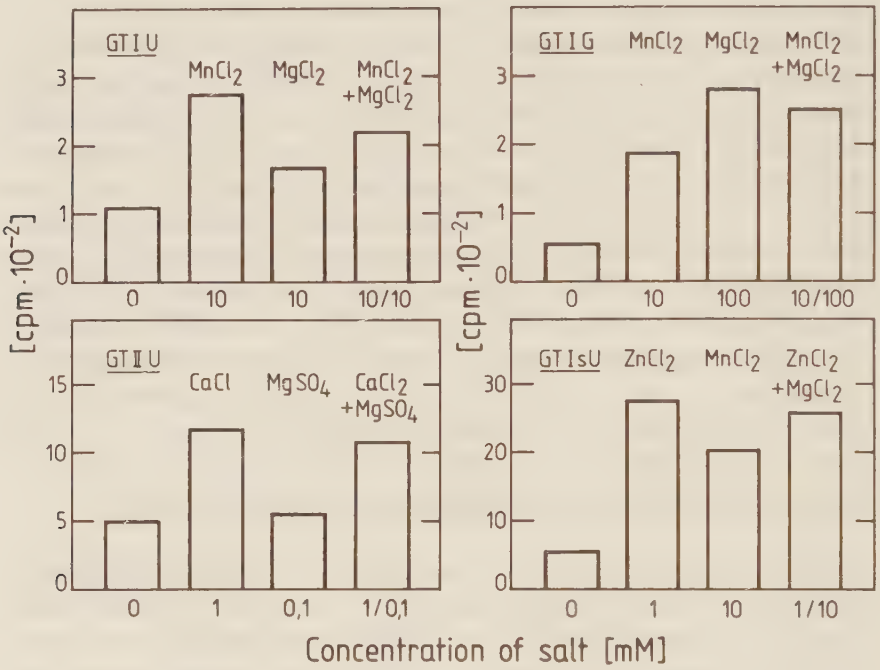


Abb. 12: Einfluß kombinierter Ionen auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten. Protein im Test: GT IU (29 µg), GT IG (11 µg), GT IIU (24 µg), GT IsU (21 µg).

3.6.3. Einfluß von EDTA und EGTA auf die Enzymaktivitäten

Aus Abb. 11 wird deutlich, daß GT IU und GT IG auf die Anwesenheit zweiwertiger Ionen ($Mg^{2+}$ oder $Mn^{2+}$) im Testansatz angewiesen sind. Die Glucosyltransferase IIU wird durch $Ca^{2+}$ stimuliert. Arbeitet man mit EDTA-haltigen Puffern ohne $Mg^{2+}$- oder $Ca^{2+}$-Ionen, so ist die spezifische Aktivität

der GT IIU in Abhängigkeit von der EDTA-Konzentration geringer als in EDTA-freien Puffern. Bei der Wanderung von GT IIU-tragenden Membranvesikeln durch lineare Saccharose-Gradienten, die in EDTA-haltigen Puffern angesetzt wurden, verringert sich die Enzymaktivität beständig, und das Enzym ist nach dem Lauf in keiner Gradientenfraktion mehr nachweisbar (INGOLD, 1982).

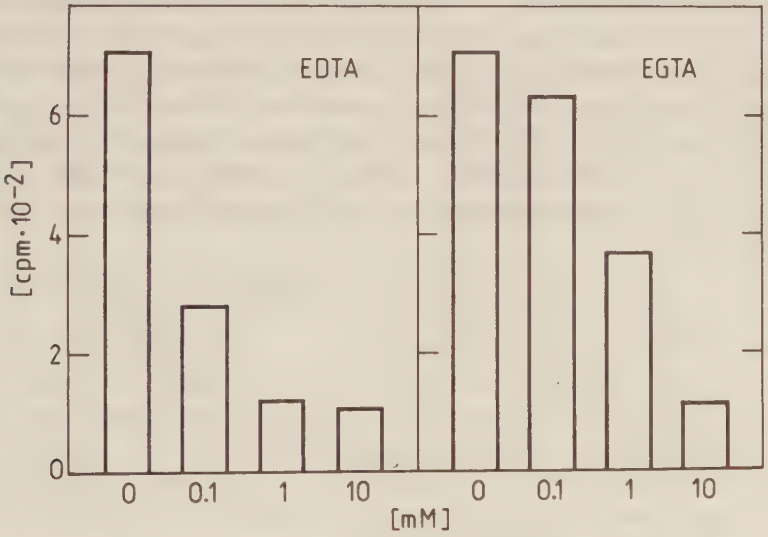


Abb. 13: Einfluß von EDTA und EGTA auf GT IsU. Der Enzymtestansatz enthielt keine exogen zugesetzten Ionen. Testbedingungen: 23 µg Protein, 3 min, 40 °C.

Abb. 13 zeigt, daß auch GT IsU durch steigende Konzentrationen der Komplexbildner gehemmt wird. Dabei ist EDTA wirksamer als EGTA. Dieses Enzym wird ebenfalls durch zweiwertige Kationen stimuliert. $Zn^{2+}$ ist besonders wirksam. Dieser Versuch wurde jedoch in Abwesenheit exogener Ionen durchgeführt. Die Komplexbildner entziehen der Proteinlösung also Ionen, die bereits endogen vorlagen. Um welche Ionen es sich dabei handelt ($Mg^{2+}$, $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$ oder $Zn^{2+}$), kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, obwohl EDTA in gewissen Konzentrationsbereichen spezifisch für die Bindung von $Mg^{2+}$ und EGTA für die von $Ca^{2+}$ ist.

### 3.7. Einfluß von Cellobiose auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten

Cellobiose ist ein Faktor, den man häufig in Beschreibungen des Testansatzes findet (HAASS et al., 1981; FÈVRE, 1983b; CALLAGHAN und BENZIMAN, 1984). DELMER et al. (1977) berichteten über eine Aktivierung der Glucansynthetasen bei Baumwolle durch Cellobiose. Über den Mechanismus, wie diese Stimulierung zustandekommt, gibt es aber keine gesicherten Vorstellungen. Eine Möglichkeit wäre, daß die Cellobiose als Startermolekül die Glucankettenbildung initiiert. Diese würde auch der Vorstellung von MACLACHLAN et al. (1979) entsprechen, die die Verfügbarkeit von "Primermolekülen", besonders im Falle von Vesikel-Fraktionen oder gelösten Enzymen als limitierenden Faktor für die Enzymaktivität ansahen. Es konnte aber nicht gezeigt werden, daß die zugesetzte Cellobiose in die sich bildende Glucankette mit eingebaut wird.

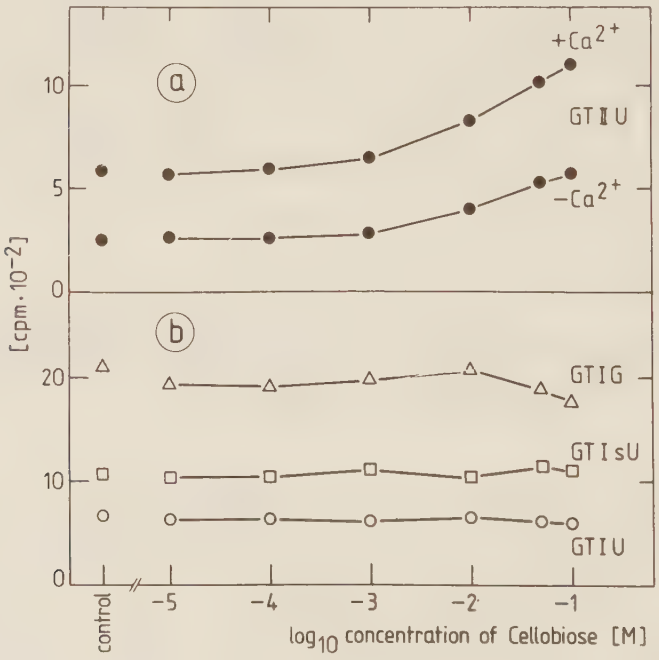


Abb. 14: Effekt von Cellobiose auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten. (a) GT IIU (38 µg) mit und ohne $CaCl_2$ im Testansatz. (b) GT IU (80 µg), GT IG (38 µg), GT IsU (12 µg). Proteinangaben in Klammern.

Von den Glucosyltransferasen aus Daucus carota wurde nur GT IIU von Cellobiose beeinflußt. Es ergab sich, gleichgültig ob mit oder ohne $Ca^{2+}$ im Testansatz, eine Stimulierung bei Konzentrationen größer 1 mM. Da das Produkt dieses Enzyms ein ß-1,3-Glucan ist (siehe Abb. 24 und 25), ist eine Funktion von Cellobiose als Startermolekül, wenn auch nicht ausgeschlossen, so doch unwahrscheinlich. Die Aktivität der GT IIU ließ sich in diesem Versuch durch $Ca^{2+}$ von 1440 auf 3200 $pMole.min^{-1}.mg^{-1}$ steigern. Wird noch Cellobiose zugegeben, so erhielt man noch einmal eine Verdoppelung des Einbaus auf 6070 $pMole.min^{-1}.mg^{-1}$. Die anderen Glucosyltransferasen blieben dagegen völlig unbeeinflußt. Auf den routinemäßigen Einsatz von Cellobiose wurde verzichtet, da eine nennenswerte Aktivierung erst bei Konzentrationen auftrat, bei denen Cellobiose nur schlecht löslich ist. (Sie wurde als 8fach konzentrierte Stammlösung dem Testsystem zugegeben.)

### 3.8. Einfluß der Substratkonzentration

Die Bestimmung der $K_m$ ist ein wichtiger Punkt bei der Charakterisierung eines Enzyms. Im Falle der Glucosyltransferasen sind allerdings ein paar Anmerkungen notwendig. Da es sich mit Ausnahme der GT IsU um membranintegrale Proteine handelt und eine Solubilisierung und vollständige Reinigung von aktiven Proteinen bisher nicht gelungen ist, erfolgte die Bestimmung der apparenten $K_m$ aus Membranfraktionen. Es besteht die Möglichkeit, daß Fremdeinflüsse durch andere Enzyme auftreten können. Vor allem andere UDP-Glucose-Glucosyltransferasen würden besonders dann störend wirken, wenn die Selektivität des Testsystems nicht vollkommen ist. Durch Auftrennung der Membranen nach ihrer Dichte läßt sich zwar eine Trennung der Glucosyltransferasen erzielen (Abb. 5 und 7), die Schulter der GT IIU bei 27 - 36 % Saccharose, d. h. im Bereich, wo GT IU ihr Maximum hat, deutet aber an, daß entweder beide Enzyme auch in gleichen Membranen vorkommen oder in verschiedenen Membranen, die sich in ihrer Dichte sehr ähnlich sind. Schließlich ist auch nicht ausgeschlossen, daß es sich um eine weitere Glucosyltransferase handelt.

#### 3.8.1. GT IIU

Abb. 15 zeigt die Abhängigkeit des Enzyms von der UDPG-Konzentration ohne und mit den Aktivatoren $CaCl_2$ und Cellobiose. Zeichnet man die Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration auf, erhält man Hyperbeln, die eine formale Behandlung nach Michaelis-Menten zulassen. Es wird deut-

lich, daß sowohl die Affinität zum Substrat als auch die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erhöht wird.

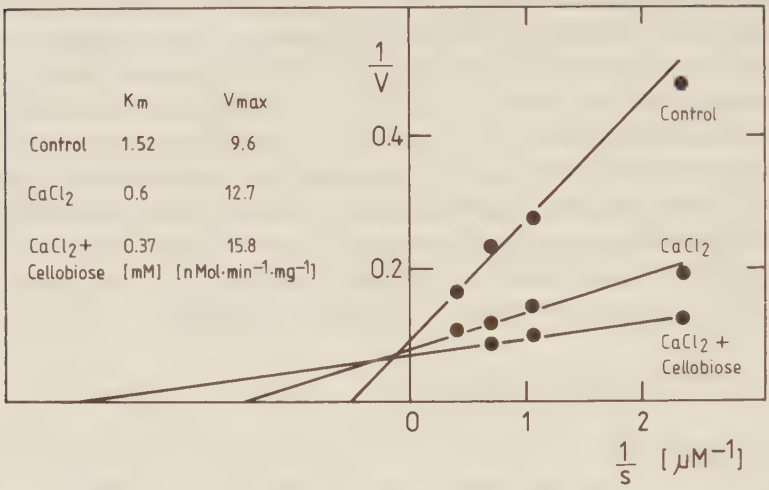


Abb. 15: Substratabhängigkeit von GT IIU. Einfluß von $CaCl_2$ und Cellobiose auf die app. $K_m$ und die app. Vmax. Testbedingungen: 50 µg Protein, 5 min, 25 °C. Diagramm nach Lineweaver-Burk.

3.8.2. GT IU und GT IG

Die Messung dieser beiden Enzymaktivitäten unterscheidet sich nur in der Art, in der Glucose im Test angeboten wird. Dabei wird UDPG zur Messung von Glucansynthetasen weit häufiger verwendet als GDPG. Beide Substanzen wurden aber als mögliche Substrate bei der Cellulosesynthese genannt (Übersicht von DELMER, 1983).

In Abb. 16 sind die Substrat-Sättigungskurven der GT IU und GT IG zusammen mit der Auftragung nach Lineweaver und Burk dargestellt. GT IG zeigt eine typische Michaelis-Menten-Kinetik. Die app. $K_m$ wurde mit 1,33 µM bei einer Vmax von 574 $pMolen.min^{-1}.mg^{-1}$ Protein ermittelt. Bei GT IU zeichnet sich zwar ebenfalls ein hyperboler Kurvenverlauf ab, die Kurve kommt aber nicht in Sättigung. Bietet man mehr Substrat an (getestet bis 3 mM) wird immer mehr Glucose in Glucane eingebaut. Von einer solchen "Substrataktivierung"

einer Glucansynthetase aus Baumwolle berichtete auch DELMER (1977). Dieses Verhalten hat hinsichtlich der Bestimmung der app. $K_m$ beträchtliche Konsequenzen. Je nach dem, welchen Substrat-Konzentrationsbereich man zur Bestimmung der app. $K_m$ auswählt, erhält man verschiedene Werte. Mit ansteigenden Substratkonzentrationen steigt sowohl die app. $K_m$ als auch die app. Vmax an. Die app. $K_m$ für den dargestellten Versuch in Abb. 16a betrug 85,4 µM, die app. Vmax 686 pMole.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ (siehe Tab. 11).

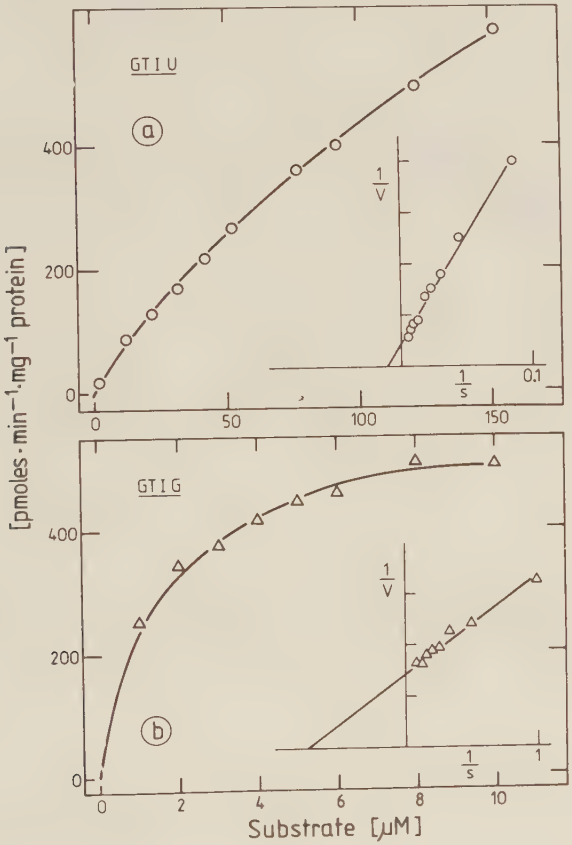


Abb. 16: Substratabhängigkeit von (a) GT IU: 46 µg, 3 min, 25 °C; UDP-$^{14}$C-Glucose 2 µM; (b) GT IG: 46 µg, 30 sec, 25 °C; GDP-$^{14}$C-Glucose 1 µM. Darstellung nach Michaelis-Menten; Nebenbild: Lineweaver-Burk-Diagramm.

3.8.3. GT IsU

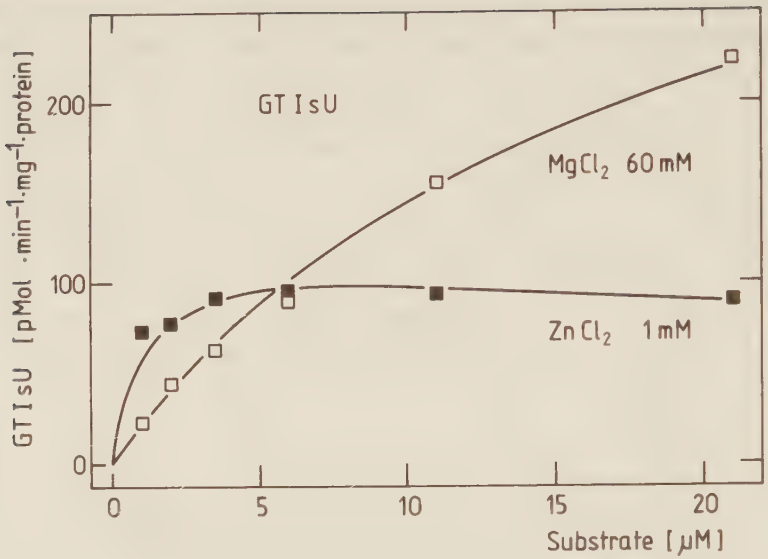


Abb. 17: Substratabhängigkeit von GT IsU. Vergleich von Testansätzen mit $MgCl_2$ und $ZnCl_2$. Testbedingungen: 20 µg Protein, 3 min, 40 °C.

Dieses Enzym ist das einzige der untersuchten, welches löslich ist und durch Zentrifugation und Ammoniumsulfat-Fällung bereits teilgereinigt wurde. In III.3.6. wurde dargelegt, daß $Zn^{2+}$ dieses Enzym sehr stark aktiviert. Die Substrat-Sättigungskurven in Abb. 17 mit $MgCl_2$ und $ZnCl_2$ unterscheiden sich sehr. In Anwesenheit von $ZnCl_2$ im Test arbeitet das

Enzym bei niederen Substratkonzentrationen viel besser als mit $MgCl_2$. Die Affinität zum Substrat ist beträchtlich erhöht (von $K_m$ 8,5 µM auf 0,55 µM). Es wird aber schon sehr bald eine Reaktionsgeschwindigkeit erreicht, die sich auch bei steigender Substratkonzentration nicht mehr erhöht (108 $pMole.min^{-1}.mg^{-1}$). Im Ansatz mit $MgCl_2$ dagegen ist die maximale Reaktionsgeschwindigkeit im verwendeten Konzentrationsbereich noch nicht erreicht (317 $pMole.min^{-1}.mg^{-1}$), d. h. obwohl mit $ZnCl_2$ die Affinität zum Substrat steigt, sinkt die Vmax. Eine Erklärungsmöglichkeit für dieses Verhalten wäre eine eintretende Substrathemmung. Sekundärauswertungen, mit denen man dies untersuchen kann (Lineweaver-Burk oder V gegen log S ; DIXON und WEBB, 1979), belegen diese Möglichkeit nicht eindeutig. Kooperative Effekte, wie sie bei allosterisch regulierten Enzymen auftreten, sind ebenfalls denkbar. Die Substrat-Sättigungskurven haben aber keinen sigmoiden Verlauf, wie es für solche Enzyme typisch ist. Ebenso ist für dieses Enzym nicht gezeigt, daß es aus mehreren Untereinheiten zusammengesetzt ist, obwohl sein relativ hohes Molekulargewicht (siehe III.6.5.) dies möglich erscheinen läßt. Aus Abb. 19 wird deutlich, daß GT IsU sehr stark gehemmt wird durch UDP. UDP wird beim Transfer der Glucose von UDP-Glucose auf den Akzeptor freigesetzt und reichert sich somit im Testansatz an. Wenn man nun annimmt, daß $Zn^{2+}$ zwar eine Erhöhung der Affinität zum Substrat bewirkt, gleichzeitig aber die Affinität zu UDP stärker gesteigert wird, so könnte dies zu einer Erniedrigung der app. $K_m$ bei gleichzeitiger Erniedrigung der Vmax führen. Die Reaktionsgeschwindigkeit nimmt mit zunehmender Substratkonzentration bei $Zn^{2+}$-Anwesenheit schneller zu. Dadurch erhöht sich auch die Konzentration an UDP. Ab einer bestimmten UDP-Konzentration kommt nun auf Grund der vergrößerten Affinität zu UDP der Hemmeffekt zum Tragen. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit, die theoretisch möglich wäre, wird nicht mehr erreicht. Um diese Frage endgültig klären zu können, reichen aber die vorhandenen Daten nicht aus und die Erklärungsversuche müssen hypothetisch bleiben.

### 3.8.4. Substratabhängigkeit der Glucosyltransferasen bei verschiedenen Testbedingungen

Auf Grund verschiedener Experimente zur Charakterisierung der Glucosyltransferasen wurden im Verlauf der Versuche die Testbedingungen abgeändert. Tab. 11 gibt eine Aufstellung der apparenten $K_m$, die unter verschiedenen Bedingungen erhalten wurden. Zur Absicherung der Daten wurden die Werte der app. $K_m$ und Vmax ebenfalls nach Eadie und Hofstee bestimmt.

Tab. 11: Apparente $K_m$ der Glucosyltransferasen, ermittelt bei verschiedenen Testbedingungen. Die Werte wurden nach Lineweaver-Burk bestimmt. Als Enzymquelle diente das 14 K Sediment bzw. mit Ammoniumsulfat gefälltes Protein für GT IsU.

| Testbedingungen | Substratbereich (µM) | app. $K_m$ (µM) |
|---|---|---|
| GT IU 25 °C | | |
| $MgCl_2$ 60 mM | 0,1 - 126 | 12,3 |
| | 0,1 - 3001 | 45 |
| | 1 - 1001 | 374 |
| | 126 - 3001 | 970 |
| $MnCl_2$ 10 mM | 1 - 11 | 17,2 |
| | 1 - 41 | 39,6 |
| $MgSO_4$ 60 mM | 1 - 21 | 29,7 |
| | 1 - 41 | 80 |
| | 2 - 32 | 64 |
| | 2 - 152 | 85,4 |
| GT IG 25 °C | | |
| $MgCl_2$ 60 mM | 1 - 11 | 2,2 - 3 |
| $MnCl_2$ 10 mM | 1 - 11 | 3,9 - 4,2 |
| $MgSO_4$ 60 mM | 1 - 11 | 1,2 - 1,8 |
| GT IIU 25 °C | | |
| ohne | 1 - 3001 | 2300 |
| | 420 - 2420 | 1530 |
| $CaCl_2$ 1 mM | 420 - 2420 | 600 |
| $CaCl_2$ 1 mM + Cellobiose 50 mM | 420 - 2420 | 370 |
| GT IsU 40 °C | | |
| $MgCl_2$ 60 mM | 0,5 - 13 | 1,9 |
| | 1 - 14 | 2,6 |
| | 1 - 21 | 8,5 |
| $ZnCl_2$ 1 mM | 1 - 11 | 0,66 |
| | 1 - 21 | 0,55 |

Die Anwesenheit bestimmter Ionen wirkt sich bei allen Enzymen in der app. $K_m$ aus. Sie liegt für GT IG und GT IsU im mikromolaren Bereich (0,5 - 2 µM), bei GT IIU dagegen im millimolaren Substrat-Konzentrationsbereich (0,4 - 2 mM). Auf die Schwierigkeiten der Bestimmung der $K_m$ bei GT IU wurde bereits hingewiesen (III.3.8.2.). Man erhält Werte von 12 µM bis 970 µM, je nachdem, welchen Substrat-Konzentrationsbereich man zur Messung gewählt hat. Dieser Effekt ist vorhanden, gleichgültig, ob $Mg^{2+}$- oder $Mn^{2+}$-Ionen im Testansatz enthalten sind.

Neben der Erklärung, daß eine Substrataktivierung erfolgt, könnte es auch so sein, daß mit steigender Substratkonzentration ein weiteres Enzym aktiv wird. Wie in III.3.6. gezeigt wurde, arbeitet GT IU nur in Anwesenheit von Ionen im Test. GT IIU wird durch die Anwesenheit hoher Ionenkonzentrationen gehemmt. Eine Restaktivität ist aber im Falle von $MgSO_4$ (60 mM) durchaus noch vorhanden. Diese könnte für die $K_m$- und Vmax-Verschiebung verantwortlich sein. Bei 10 mM $MnCl_2$ war GT IIU allerdings inaktiv.

### 3.8.5. Substratabhängigkeit von GT IU und GT IG unter Einfluß von GDPG bzw. UDPG

UDPG wird am häufigsten für die Messung von ß-Glucansynthetasen als Substrat verwendet, obwohl GDPG ebenfalls ein möglicher Glucosedonator in manchen Systemen ist (DELMER, 1983). Von Enzymproben aus Suspensionszellen der Karotte wird mit GDPG viel mehr Glucose eingebaut als mit UDPG als Substrat. In beiden Fällen ist die Verknüpfung der Glucosylreste ß-1,4-glucosidisch. In linearen Saccharose-Gradienten findet man beide enzymatischen Aktivitäten in Fraktionen der gleichen Dichte. Es stellt sich die Frage, ob es sich um zwei verschiedene Enzyme handelt, die zwar in derselben Membran lokalisiert sind, aber unterschiedliche Funktion haben, oder ob es ein Enzym ist, dessen Substratspezifität nicht so ausgeprägt ist und das Glucose aus beiden Zuckernukleotiden verwenden kann. Neben dem Vergleich der Eigenschaften der beiden katalytischen Aktivitäten bei verschiedenen Einflüssen ist die Affinität zu den Substraten ein wichtiges Kriterium. Es zeigt sich, daß die app. $K_m$ mit GDPG sehr viel niedriger ist als mit UDPG. Wenn es sich um zwei verschiedene Enzyme mit strenger Spezifität zum Substrat handelt, dürfte die Anwesenheit des anderen Substrates die Enzymaktivität nicht wesentlich beeinflussen. Im andern Fall wäre eine Kompetition zu erwarten.

Die Aktivitäten der GT IU und GT IG wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Anwesenheit unterschiedlicher Mengen des zweiten Nukleotid-Zuckers bestimmt. Der Einfluß von GDPG auf die GT IU war größer als der von UDPG auf GT IG. Es trat eine Hemmung des Einbaus von Glucose aus UDPG ein.

Tab. 12: Aktivität der GT IU und GT IG in Anwesenheit von GDPG bzw. UDPG, in %, bezogen auf die Kontrolle. Enzymquelle war das 14 K Sediment mit 46 µg Protein im Test.

| GDPG (µM) | GT IU UDP-$^{14}$C-Glucose (µM) 2 | 32 | 77 | UDPG (µM) | GT IG GDP-$^{14}$C-Glucose (µM) 1 | 4 | 6 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 67 | 67 | 84 | 1 | 98 | 103 | 98 |
| 10 | 47 | 48 | 66 | 10 | 88 | 95 | 96 |
| 50 | 43 | 46 | 64 | 50 | 81 | 89 | 102 |

Selbst bei 25facher Konzentration an GDPG war die GT IU nur zu 57 % gehemmt. Nach Erhöhung der Substratkonzentration von 2 auf 32 uM waren die Hemmefekte gleich groß. Erst bei viel höheren Konzentrationen (77 µM) wurde die Hemmung durch GDPG geringer. Im umgekehrten Fall war mit UDPG selbst bei 50fachem Überschuß gegenüber dem Substrat GDP-$^{14}$C-Glucose die Enzymaktivität nur um 19 % vermindert. Die beiden Alternativsubstrate behindern den Einbau von Glucose aus dem jeweiligen anderen Substrat. Die wirksamen Konzentrationen sind allerdings sehr verschieden. GDPG hemmt auch bei geringeren Konzentrationen als die des Substrats die GT IU. UDPG hemmt die GT IG nur, wenn es selbst in hohem Überschuß vorliegt. Dies spiegelt den Unterschied in der app. $K_m$ wieder (siehe Tab. 11).

Abb. 18 zeigt die Substratabhängigkeit der GT IU und GT IG. Die GT IG ist bei 12 µM GDPG in Sättigung. Die Kurve wird durch UDPG nur wenig beeinflußt. GT IU ist auch bei 77 µM Substratkonzentration noch nicht in Sättigung. GDPG hat einen deutlichen Einfluß auf den Kurvenverlauf. Höhere Konzentrationen als 10 µM GDPG führen aber nicnt mehr zu viel stärkeren Hemmungen des Glucoseeinbaus. Die app. $K_m$ wurde nach Lineweaver und Burk sowie

Eadie und Hofstee bestimmt. Die app. $K_m$ von GT IG ändert sich unter dem Einfluß steigender UDPG-Konzentration geringfügig von 1,2 auf 1,66 µM. Ebenso sinkt die app. Vmax von 559 auf 524 pMol eingebaute Glucose pro min und mg Protein.

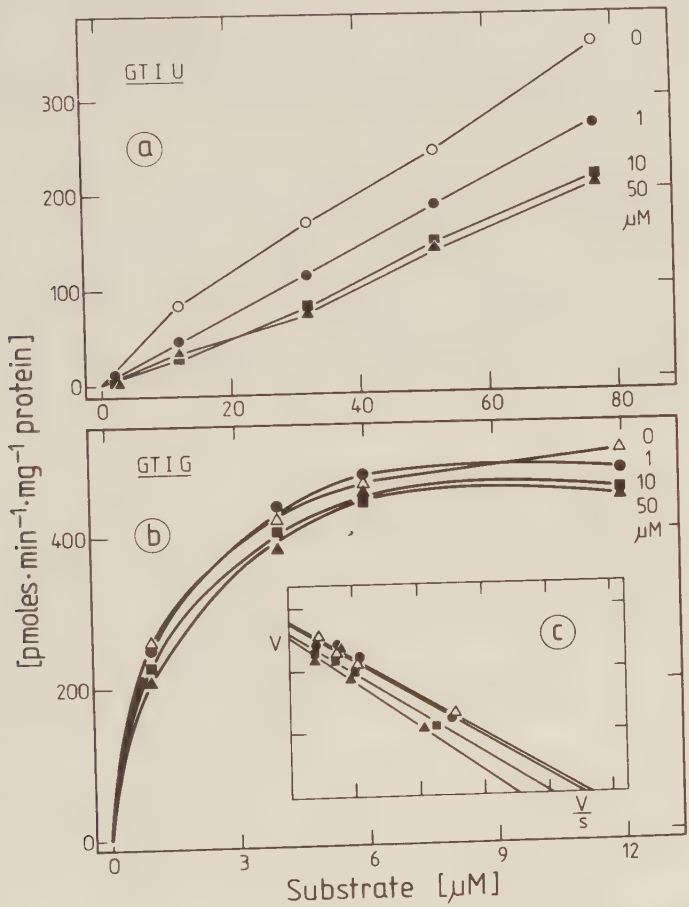


Abb. 18: Substratabhängigkeit in Anwesenheit eines möglichen Konkurrenzsubstrates. (a) GT I UDPG mit 0, 1, 10, 50 µM GDP-Glucose, (b) GT I GDPG mit 0, 1, 10, 50 µM UDP-Glucose, (c) Eadie-Hofstee-Plot von Diagramm b. Testdurchführung mit 46,5 µg Protein (14 K-Sediment) nach Tab. 3.

Für die GT IU ergibt sich eine stärkere Reduzierung der app. Vmax von 618 auf 200 pMol.min$^{-1}$.mg$^{-1}$. Die app. $K_m$ sinkt von 76 µM auf 59 µM ab. Hier scheint die Affinität zu UDPG erhöht zu werden bei gleichzeitiger Verminderung der maximalen Einbaugeschwindigkeit. Aussagen über den Mechanismus der Hemmung des Einbaus von Glucose sind nur unter Vorbehalt möglich. Bei der GT IU ist die Aktivierung des Enzyms bei steigender Substratkonzentration ein Problem. Der möglichen Hemmwirkung von GDPG ist ein gesteigerter Einbau von Glucose aus UDPG bei zunehmenden Substratkonzentrationen überlagert. Der Reaktionsmechanismus des Glucoseeinbaus ist nicht bekannt. Neben UDPG muß auch ein Akzeptor vorhanden sein, auf den der Zucker übertragen wird. Dieser Akzeptor ist letztlich die wachsende Glucankette, die dadurch beständig verändert wird. Sie ist möglicherweise an dem Enzym fixiert. Es handelt sich also nicht um eine einfache Ein-Substrat-Reaktion, für die die Michaelis-Menten-Theorie aufgestellt wurde. Die oben beschriebene Hemmung konnte keiner der bekannten Möglichkeiten eindeutig zugeordnet werden.

Sekundärauswertungen nach Dixon (1/V gegen [I]) und Cornish-Bowden (S/V gegen [I]) zur Bestimmung der Inhibitor-Konstanten waren nicht auswertbar. In beiden Fällen gab es keine Geraden, die die Ordinate schneiden, sondern hyperbolisch verlaufende Kurven. Dies sind Hinweis auf eine partiell kompetitive Hemmung (BISSWANGER, 1979) bei Mehrsubstratreaktionen (DIXON und WEBB, 1979). Für solche Fälle wird eine Sekundärauswertung der Lineweaver-Burk-Darstellung vorgeschlagen. Dabei werden die Kehrwerte der Differenz aus den Steigungen ohne und mit Inhibitor gegen die Kehrwerte der Inhibitorkonzentration aufgetragen (1/Δ Steigung gegen 1/[I]). Mittels dieser Methode wurde für GDPG bei GT IU eine Ki von 1,64 µM und für UDPG bei GT IG von 25,1 µM ermittelt. Dies entspricht gerade den in Punkt III.3.8.4. ermittelten Werten der app. $K_m$ für GT I GDPG und GT I UDPG.

### 3.9. Einfluß von Nukleotiden

Die Nukleotide ATP, ADP, UTP, UDP, GTP, GDP wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Enzymaktivitäten überprüft. ATP/ADP spielen im Energiestoffwechsel der Zellen eine dominierende Rolle. Es wäre durchaus vorstellbar, daß die membranlokalisierte Synthese der Glucane abhängig ist von z. B. einem bestimmten Membranpotential, wie es von DELMER (1981) für Baumwolle beschrieben wurde, oder auch von gewissen Ionengradienten. In vitro würde die energieabhängige Aufrechterhaltung solcher Zustände sehr schnell zusam-

menbrechen, es sei denn, man führt dem System Energie in Form von ATP zu. Beim Transfer des Zuckers auf den Akzeptor (wachsende Glucankette) wird UDP bzw. GDP frei. Es handelt sich dabei um Reaktionsprodukte, die die Enzymreaktion beeinträchtigen können. In vivo werden sich diese Substanzen wohl nicht anhäufen, sondern gleich wieder dem Stoffwechsel zugeführt. Als mögliche in vivo-Funktion der Golgi-Membran-gebundenen latenten IDPase wurde die Spaltung von UDP in UMP und Pi vorgeschlagen (RAY et al., 1969). Auf diese Weise würde UDP aus dem Reaktionsgeschehen abgezogen werden.

Auch bei Regulationsprozessen wirken Nukleotide in unterschiedlicher Form mit. So wird der Energiestoffwechsel wesentlich beeinflußt vom Verhältnis ADP zu ATP in den Zellen. Direkt auf der Ebene der Proteine findet eine Enzymregulation statt, die als Interkonversion bezeichnet wird. Das bekannteste Beispiel sind verschiedene Enzyme (Phosphorylasen a und b; Phosphorylase-Kinase) im Glykogenstoffwechsel. Durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung werden die Enzyme in einen aktiven bzw. passiven Zustand überführt. Als Donator der Phosphatgruppen fungiert dabei ATP (LEHNINGER, 1975).

Bei einer Reihe von Reaktionen ist GTP beteiligt und spielt z. B. eine große Rolle als Co-Substrat bei der Reaktion (Aktivierung der Fettsäuren) oder bei der Aktivierung von Metaboliten (Bildung von Phosphoenolpyruvat aus Oxalacetat durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Bei der Synthese von Glucanen wird der entsprechende Zucker als Nukleotidzucker bereitgestellt (z. B. ADP-Glucose bei der Stärkesynthese, UDP-Glucose und GDP-Glucose bei der ß-Glucansynthese).

In keinem der untersuchten Fälle konnte eine signifikante Aktivierung der Glucansynthese gefunden werden. Die Glucosyltransferase-Aktivitäten wurden alle bei höheren Nukleotidkonzentrationen gehemmt. Die Hemmung trat meistens erst in Konzentrationen in Erscheinung, die über der des Substrates lag. ADP und ATP hatten den geringsten Einfluß. Bis 0,1 mM blieben alle Enzyme voll aktiv. GTP und GDP hemmten am stärksten GT IU und GT IG. Hier war GT IG wesentlich empfindlicher. Auf GT IIU und GT IsU hatten diese Nukleotide fast genauso wenig Einfluß wie ADP und ATP. Die letztgenannten Enzyme wurden aber durch UTP und UDP stark gehemmt. Hier reagierte GT IsU empfindlicher. Der Hemmeffekt von UDP/UTP auf GT IU war aber nur geringfügig kleiner als die Wirkung von GDP/GTP und war viel deutlicher sichtbar als bei GT IG.

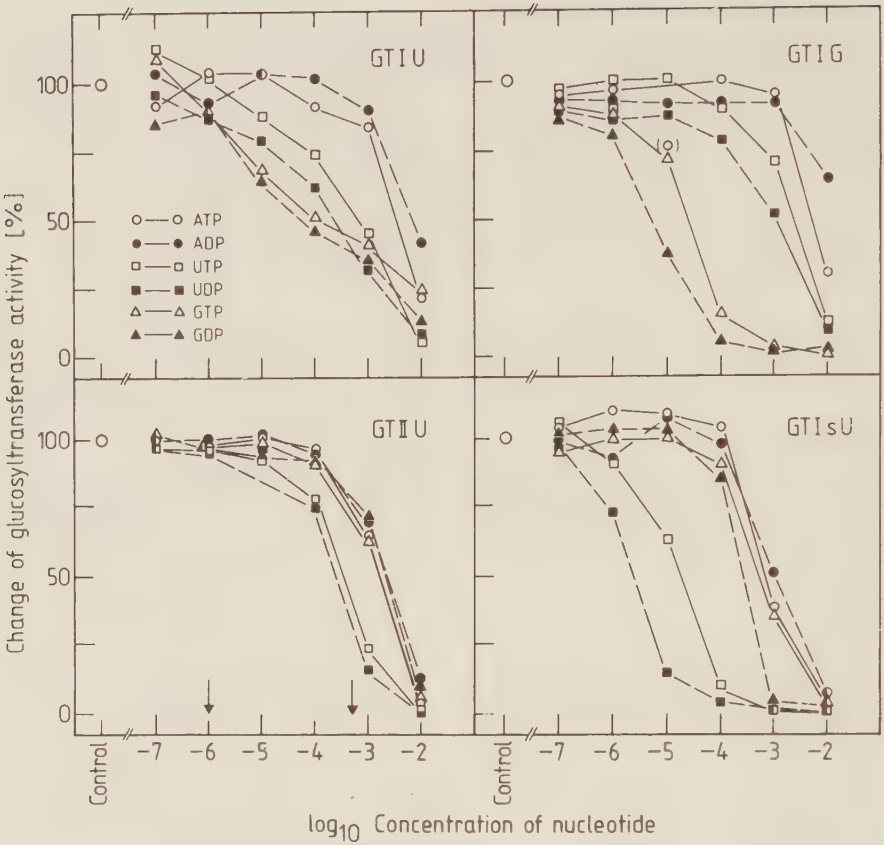


Abb. 19: Einfluß verschiedener Nukleotide auf die Aktivität der Glucosyltransferasen. Angaben in % der Kontrolle. Die Pfeile geben die Substratkonzentration im Test an: 1 µM bei GT IU (82 µg), GT IG (47 µg), GT IsU (22 µg); 0,48 mM bei GT IIU (47 µg). Proteinangaben in Klammern.

Für alle Fälle gilt, daß die Nukleosiddiphosphate größere Effekte zeigen als die Nukleosidtriphosphate. Mit Ausnahme von GT IU, wo UDP/UTP und GDP/GTP fast gleich stark hemmen, werden die Enzyme mit UDP-Glucose als Substrat von UDP/UTP am stärksten gehemmt. Bei GT IG, wo GDP-Glucose das Substrat ist, hemmen GDP/GTP am stärksten. Die Hemmungen können durch Kompetition (NDP--NDP-Zucker) oder Verschiebung des Gleichgewichts durch Konzentrationserhöhung einer der Komponenten erklärt werden. Spezifischere Regulationsmechanismen scheinen keine Rolle zu spielen, da die Konzentrationen, bei denen eine Hemmung eintritt, relativ hoch sind.

Es ist noch anzumerken, daß Wechselwirkungen zwischen divalenten Kationen und den Nukleotiden (Komplexbildung) die Wirkung der Nukleotide beeinflussen könnten. Das Ionenangebot in den Testansätzen der vier Enzyme war verschieden. Dieses Problem wurde aber nicht weiter untersucht.

### 3.10. Einfluß von Nukleotid-Zucker

Neben Zellwandkomponenten, die aus einem einzigen Zuckermonomer aufgebaut sind (Homoglycane wie Glucane, Mannane, Xylane), gibt es auch eine Reihe von Substanzen, an deren Aufbau verschiedene Zucker beteiligt sind (Heteroglycane). Bei den Xyloglucanen werden Xylosylreste an ein Glucan "back bone" angehängt (RAY, 1980; HAYASHI und MATSUDA, 1981). In ähnlicher Weise setzen sich Glucomannane aus Glucose und Mannose zusammen (BRETT, 1981). Besonders bei Glycoproteinen (konjugierte Verbindung) findet man in den Oligosaccharid-Seitenkette eine Reihe verschiedener Zucker und Zuckerderivate (Galaktose, Mannose, Arabinose, N-Acetylglucosamin, Fucose; LAMPORT, 1980). Auch diese Zucker werden als Zucker-Nukleotide von der Zelle für den Glycosyltransfer bereitgestellt. Für die Synthese solcher konjugierter Verbindungen ist ein aufwendiger Mechanismus zu fordern. Es müssen mehrere Enzyme mit entsprechenden Spezifitäten (Substrat und Wirkung) an der Synthese beteiligt sein. Der zeitliche Ablauf der Glycosylierungsreaktionen muß gut reguliert sein, damit eine definierte Zuckersequenz entsteht. Die Anwesenheit von zusätzlichen Nukleotid-Zuckern in den Glucosyltransferase-Testansätzen kann unter Umständen zwei Fragen beantworten: 1. Wie groß ist die Substratspezifität des Enzyms? Wird die Reaktion durch solche "Alternativ-Substrate" beeinträchtigt? 2. Ist die gemessene Enzymaktivität vielleicht nur eine Teilreaktion bei der Synthese eines Heteroglycans? In diesem Fall wäre es möglich, daß das Enzym nicht optimal arbeitet, da die zweite Substratkomponente fehlt. Es sei denn, einzelne Untereinheiten (z. B. Glucan und Mannan) werden getrennt synthetisiert und in einem späteren abgekoppelten Schritt aneinandergehängt.

In Vorversuchen wurde der Einfluß verschiedener Zucker-Nukleotide auf die Glucosyltransferasen untersucht. Die Konzentration war gleich wie die des radioaktiv markierten Substrats.

Tab. 13: Einfluß von Zucker-Nukleotiden und Glucose-P auf die Glucosyltransferasen. Die Konzentration im Test war 1 µM bzw. 0,48 mM bei GT IIU. GT IG wurde bei 2 Inkubationszeiten gemessen.

| Effektor | GT IU | GT IG | | GT IIU | GT IsU |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 30 sec | 30 min | | |
| $H_2O$ Kontrolle | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| UDP-Gluc | - | 98 | 106 | - | - |
| GDP-Gluc | 76 | - | - | 88 | 97 |
| UDP-Gal | 100 | 102 | 105 | 70 | 26 |
| UDP-Xyl | 113 | 92 | 99 | 58 | 39 |
| UDP-GlucNac | 116 | 93 | 108 | 81 | 101 |
| GDP-Man | 124 | 73 | 166 | 88 | 106 |
| Gluc-1-P | 111 | 92 | 104 | 86 | 106 |

GT IU wird nur durch GDP-Glucose leicht gehemmt. Die anderen Effektoren haben bei dieser Konzentration leicht positiven Einfluß. GT IIU wird von UDP-Gal und UDP-Xyl stark beeinträchtigt. Das gleiche gilt für GT IsU, wo die Wirkung noch stärker ist. Bei GT IG gibt es einen interessanten Effekt. Bei kurzen Testzeiten tritt mit GDP-Man eine Hemmung ein, bei längeren Testzeiten ist der Einbau von Glucose um 66 % größer als in der Kontrolle. Dieser Punkt spielt in III.7. eine wichtige Rolle. Man muß berücksichtigen, daß sowohl der Zuckeranteil als auch das Nukleotid mit dem Enzym in Wechselwirkung treten kann. Der Vergleich der Nukleotidzucker untereinander (UDP-Gal, -Xyl, -GlucNac und GDP-Gluc, GDP-Man) deutet aber darauf hin, daß die Wirkung von den Zuckerkomponenten ausgeht. Von Ansätzen, bei denen sich signifikante Änderungen ergaben, wurden Konzentrationsreihen gemessen (Abb. 20).

Sehr deutlich wird die Hemmwirkung von UDP-Gal und UDP-Xyl auf GT IsU und GT II. GT IIU ist dabei weit unempfindlicher als GT IsU. Bei gleicher Konzentration wie der des im Test verwendeten radioaktiv markierten Substrates liegt die Restaktivität bei GT IsU um 30 - 40 %, bei GT II bei 60 - 80 %. GT IG bleibt auch in hohen Konzentrationen von UDP-Xyl und UDP-GlucNac

unbeeinflußt. Hemmung tritt dagegen auf mit GDP-Man und UDP-Gluc. GT IU wird am stärksten gehemmt von UDP-Xyl und GDP-Gluc. Mit GDP-Gluc bleibt die Restaktivität aber auch bei steigenden Konzentrationen auf etwa 40 %. Der Einbau von Glucose wird bei diesem Enzym ebenfalls durch GDP-Man und in gerigerem Maße durch UDP-GlucNac behindert. Es fällt auf, daß bei allen Enzymen mit UDP-Gluc als Substrat UDP-Xyl sehr stark hemmt. Dies ist nicht der Fall bei GT I GDP-Glucose. Dies könnte doch darauf hinweisen, daß der Nukleotidanteil bei der Hemmwirkung eine Rolle spielt.

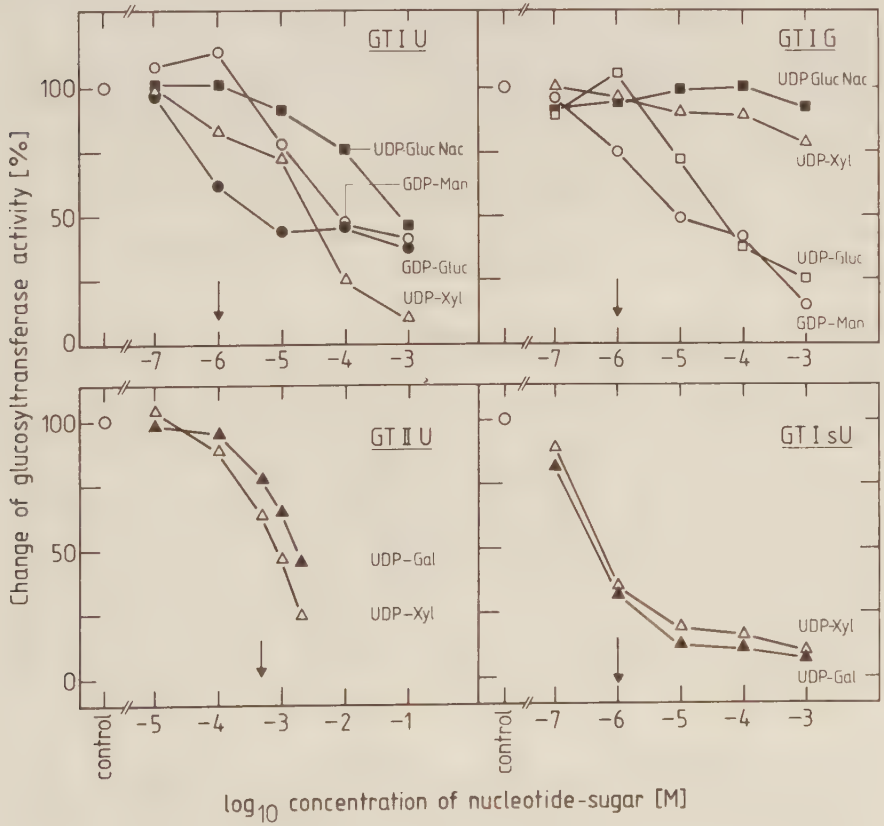


Abb. 20: Effekt von Nukleotid-Zucker auf den Einbau von $^{14}C$-Glucose durch GT IU (57 µg, 6 min), GT IG (21 µg, 30 sec), GT IIU (36 µg, 5 min), GT IsU (9 µg, 3 min). Pfeile geben die Konzentration des radioaktiv markierten Substrates an.

Dieser Versuchsansatz kann nicht die Frage beantworten, ob auch aus dem zweiten Substrat Zucker in ein Produkt eingebaut wurde (siehe dazu III.7.). Eine auftretende Hemmung schließt diese Möglichkeit nicht aus. Die unterschiedlichen Reaktionen der Glucosyltransferasen geben dennoch indirekt Hinweise auf den Charakter der vier Enzyme.

### 3.11. Einfluß von "Inhibitoren" der Glucansynthese und anderen Effektoren

In der Literatur sind eine Reihe von Effektoren beschrieben, die auf die Synthese von Zellwandbestandteilen einen negativen Einfluß haben. Dabei handelt es sich meistens um in vivo-Effekte. Manche der Hemmstoffe sollen sehr spezifisch die Bildung bestimmter Substanzen oder Syntheseschritte beeinflussen. Im folgenden wird der Einfluß einer Reihe solcher Effektoren auf die Glucosyltransferasen in vitro dargestellt. Zum besseren Verständnis werden die Effektoren kurz charakterisiert. Die Auswahl des Konzentrationsbereiches erfolgte auf Grund von Literaturwerten. Die Membranen wurden mit den Wirkstoffen 5 min vorinkubiert.

#### 3.11.1 Inhibitoren der Cellulosesynthese

Coumarin: Coumarin inhibiert die Synthese von Zellwandmaterial (vor allem von Cellulose) bei höheren Pflanzen (HARA et al., 1973; BURGESS und LINSTEAD, 1977) und bei Acetobacter xylinum (SATOH et al., 1976). MONTEZINOS und DELMER (1980) beschrieben eine Hemmwirkung von Coumarin auf die Cellulosesynthese in Baumwollfasern. Die Effekte von Coumarin sind aber sehr komplex und möglicherweise indirekte Auswirkungen auf die Zellwandsynthese. So wird der Einbau von Leucin, Thymidin und Uridin bei Tabak-Protoplasten in Anwesenheit von Coumarin drastisch reduziert (ZELCER und GALUN, 1980).

2.6.-Dichlorobenzonitril: 2.6.DCB, ein Herbizid, soll dagegen sehr direkt auf die Synthese der Zellwand einwirken. Es wurden keine hemmende Effekte auf die DNA-Synthese, Protein-Akkumulierung oder Mitose gefunden (GALBRAITH und SHIELDS, 1982). Eine Hemmung der in vivo-Cellulosesynthese durch 2.6.DCB wurde in den unterschiedlichsten Systemen gefunden (HOGETSU et al., 1974; MEYER und HERTH, 1978). Nur CALLAGHAN und BENZIMAN (1984) berichteten nach meinem Wissen bisher von einer in vitro-Wirkung von 2.6.DCB.

Sowohl bei Coumarin als auch 2.6.DCB wird die Hemmung aufgehoben, wenn die Zellen in Effektor-freie Medien überführt werden.

Bei den vier Glucosyltransferasen aus Daucus carota gab es keine signifikante Hemmung des Glucosyltransfers durch die beiden Effektoren. Auch bei zunehmender Inhibitorkonzentration sanken die Enzymaktivitäten nicht unter 80 % der Kontrolle. Teilweise wurden auch leichte Erhöhungen der Enzymaktivitäten beobachtet, die aber ebenfalls 20 % nicht überstiegen. Da die Hemmstoffe in vivo relativ spezifisch die Cellulosesynthese hemmen, könnte man zunächst zu dem Schluß kommen, daß diese Enzyme nichts mit der Cellulosesynthese zu tun haben. Da der molekulare Wirkungsmechanismus der Hemmung und auch der Cellulosesynthese nicht bekannt sind, ist dieser Schluß jedoch nicht zulässig. Die Hemmung könnte auch auf indirektem Wege erfolgen und trotzdem spezifisch sein. Zudem sind die Bedingungen durch den Zellaufschluß grundlegend verändert. Daß 2.6.DCB den in vitro-Einbau von Glucose in ß-1,4-Glucane inhibierte, werteten CALLAGHAN und BENZIMAN (1984) als positiven Hinweis auf eine Cellulosesynthese in vitro. Die Autoren haben inzwischen die Arbeit widerufen (CALLAGHAN und BENZIMAN, 1985).

### 3.11.2. Inhibitoren der ß-1,3-Glucan-Synthese

Papulacandin B ($C_{47}H_{64}O_{17}$): Papulacandin B ist ein Antibiotikum, das von Papularia sphaerosperma produziert wird. Die Substanz enthält Glucose- und Galaktose-Reste und zwei unterschiedlich lange ungesättigte Fettsäuren, was ihren amphophilen Charakter bedingt. Papulacandin B inhibiert die Glucansynthese in Hefen, hat aber auf Bakterien, Protozoen und andere Pilze nur geringe oder keine Wirkungen (BAGULEY et al., 1979). Studien von RÖMMELE et al. (1983) zeigten, daß die lange Fettsäure-Kette für die biologische Aktivität wichtig ist. Die kurze Fettsäure-Kette und der Galaktosyl-Rest haben möglicherweise etwas mit dem Eindringen des Stoffes in die Zellen zu tun. PÉREZ et al. (1983) beschrieben die Hemmung des Einbaus von Glucose in Alkohol-lösliche und -unlösliche Glucanfraktionen durch Papulacandin B bei Geotrichum lactis.

TH-Echinocandin B und das Derivat TH-Echinodandin B-(2-aminoaethyl)-aether: Echinocandine konnten aus verschiedenen Aspergillus Species isoliert werden. Sie haben eine vollkommen andere Struktur als Papulacandin (TRABER et al., 1979). TH-Echinocandin setzt sich aus einem cyclischen Oligopeptid (6 Aminosäuren), welches über eine Amid-Bindung an eine Linolsäure geknüpft ist, zusammen ($C_{52}H_{85}N_7O_{16}$). Die Derivatisierung zum Aminoaethyl-Aether erhöht die Löslichkeit in Wasser und verbessert somit die Handhabung. Echinocandin B verursacht die Lyse von wachsenden Zellen von Candida

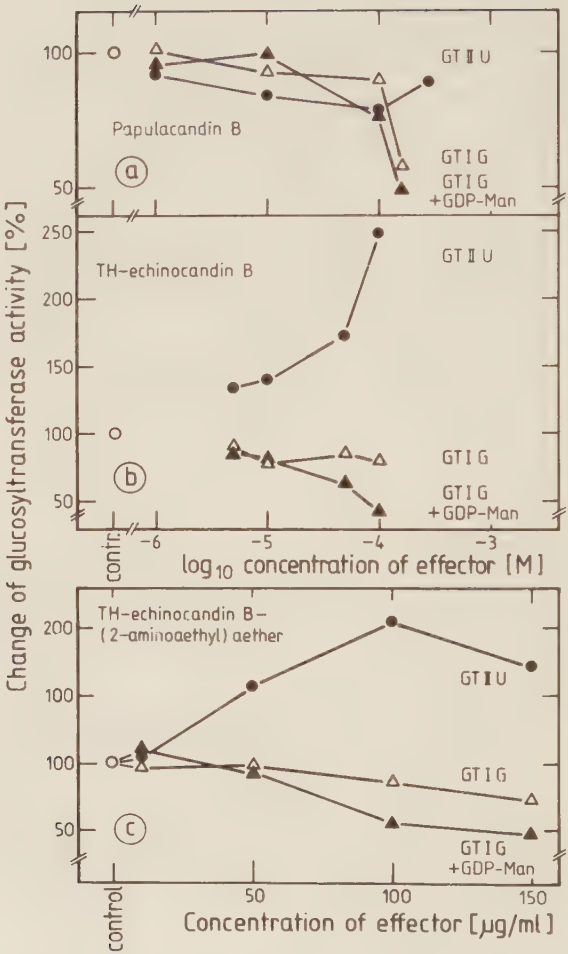


Abb. 21:
Einfluß von Effektoren, die die ß-1,3-Glucansynthese in bestimmten Pilzen hemmen. (a) Papulacandin B. (b) TH-Echinocandin B. (c) TH-Echinocandin B-(2-aminoaethyl)-aether. GT IIU in (a) mit 60 µg Protein; die übrigen Messungen wurden mit jeweils 30 µg Protein durchgeführt; GT IG (1 min); GT IIU (10 min); GT IG mit GDP-Man (30 min).

albicans 6406 (CASSONE et al., 1981). Die gleichen Authoren berichteten von einer teilweisen Hemmung der Glucansynthese in intakten Zellen aber nicht von anderen Wandkomponenten. SAWISTOWSKA-SCHRÖDER et al. (1984) zeigten, daß Echinocandin (10 - 100 $\mu g.ml^{-1}$) bei Candida albicans die ß-1,3-Glucansynthase-Aktivität, gemessen aus Membranfraktionen, hemmt. Die app. Vmax wird reduziert, wohingegen die app. $K_m$ nicht beeinflußt wird. Die Wirkung entfaltet sich möglicherweise über Lipidfaktoren in der Membran. Versuche mit resistenten Mutanten von Candida albicans gegen Aculeacin A,

einem Antibiotikum, das in der Struktur dem Echinocandin B sehr ähnlich ist, zeigten, daß diese eine andere Lipid- und Sterol-Zusammensetzung haben als empfindliche Stämme (METHA et al., 1982). Bei Solanum tuberosum fand HEININGER (1983) in vitro keinen hemmenden Einfluß von Echinocandin B und Papulacandin B.

Papulacandin B reduzierte die Aktivität der ß-1,3-Glucansynthetase (GT IIU) nur um 10 - 20 %. Bei sehr hohen Konzentrationen ( > 0,1 mM) wurde die GT IG, mit und ohne GDP-Mannose gemessen, um 50 % gehemmt. Die Hemmung bei GT IU betrug 35 %. Ein sehr interessantes Ergebnis wurde mit TH-Echinocandin und dessen Derivat erzielt. Dieses Antibiotikum aktivierte die GT IIU. Dabei wurden Werte von 245 bzw. 206 %, bezogen auf die Kontrolle, erreicht. Dies steht gerade entgegengesetzt der Hemmwirkung, wie sie in der Literatur beschrieben wird. Die anderen Glucosyltransferasen erfuhren keine Aktivierung. Bei GT IG mit und ohne GDP-Mannnose tritt dagegen wieder Hemmung ein (20 - 60 %). Hierbei ist GT IG ohne GDP-Man empfindlicher. Dieser Wirkstoff scheint im Gegensatz zu Papulacandin B direkt in Enzymnähe zu wirken. Trotz des gegenteiligen Effektes bei Pilzen und hier bei der Karotte ist es doch bei beiden die ß-1,3-Glucansynthese, die betroffen ist. Die wirksamen Konzentrationen liegen im selben Bereich.

### 3.11.3. Calcofluor white

Calcofluor white ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der zum Nachweis von Cellulose, besonders bei Zellwand-regenerierenden Protoplasten benützt wird (GALBRAITH, 1981). Es verhindert die Ausbildung normaler Fibrillen von Cellulose in Acetobacter (HAIGLER et al., 1980) und Chitin bei Poteriochromonas (HERTH, 1980). Dabei soll der Farbstoff an Glucanketten binden und so die Ausbildung größerer Strukturen (Microfibrillen) verhindern. Die Glucansynthese soll aber weiterhin ablaufen (ROBERTS et al., 1982).

Calcofluor white war der einzige Effektor, der alle vier Glucosyltransferasen hemmte. Dabei nahm die Empfindlichkeit in der Reihenfolge GT IsU, GT IG mit GDP-Man, GT IIU, GT IG und GT IU zu. Bis auf das erstgenannte Enzym waren alle bei 0,1 % (w/v) bereits vollständig gehemmt. Nur das lösliche Enzym GT IsU war weniger empfindlich.

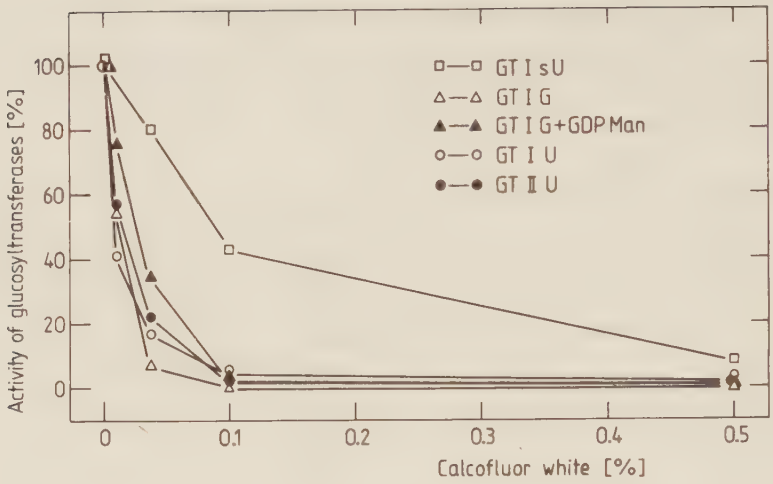


Abb. 22: Einfluß von Calcofluor white auf die Aktivität der Glucosyltransferasen. GT IsU (21 µg, 5 min, 40 °C); die anderen Enzyme wurden mit 60 µg Protein getestet. GT IU (6 min), GT IG (1 min), GT IIU (10 min). Zusätzlich wurde GT IG in Anwesenheit von GDP-Man (5 µM) gemessen (30 min).

### 3.11.4. Andere Effektoren

Deoxyglucose: In vivo verhindert Deoxyglucose die Bildung von Alkaliunlöslichen ß-1,4-Glucanen bei Prototheca zopfii (DATEMA et al., 1983). Es wird in die Zellen aufgenommen und kann in UDP- oder GDP-Deoxyglucose überführt werden.

Im in vitro-Glucosyltransferase-Test hatte Deoxyglucose (1 und 500 µM) keine Auswirkung auf den Einbau von Glucose. Wahrscheinlich muß es, um seine hemmende Wirkung entfalten zu können, zunächst an ein Nukleotid gebunden werden, was im in vitro-Ansatz nicht möglich ist.

EDTA, EGTA: Auf diese Komplexbildner wurde bereits in III.3.6.3. eingegangen. Sie binden $Mg^{2+}$ bzw. $Ca^{2+}$. Alle Glucosyltransferasen, auch die GT IsU, sind abhängig von einem gewissen Angebot an zweiwertigen Kationen. Werden EDTA und EGTA im Überschuß zugesetzt, gehen die Enzymaktivitäten zurück bis zur vollständigen Hemmung.

Filipin: Filipin ist ein polyen Antibiotikum, das an Sterole bindet (BEHNKE et al., 1984). Nach Behandlung von Membranen, die 3-ß-hydroxy-Sterole enthalten, kann man mit dem Elektronenmikroskop (Gefrierbruch-Technik) Ausbuchtungen oder Eindrücke mit einer Abmessung von 20 - 25 nm beobachten (ORCI et al., 1981). Durch die Bindung an Sterole wird die Stabilität und Fluidität der Membran beeinflußt. Ebenso soll die Permeabilität der Membranen erhöht werden (GANKEMA et al., 1981).

Bei einer Konzentration von 10 µg/ml waren die Glucosyltransferasen nicht beeinflußt. Bei 10facher Konzentration an Filipin ergaben sich nur leichte Aktivitätserhöhungen bei GT IU und GT IG (10 - 20 %). Filipin wurde noch in einem weiteren Versuch verwendet, in dem die Frage geklärt werden sollte, ob die Membranen bei der Homogenisierung "outside-out" oder "outside-in" orientierte Vesikel bilden (siehe III.2.3.).

NDA (= Tetcyclacis): NDA ist ein chemischer Wirkstoff, der ähnlich wie 2.6.DCB das Wachstum von Pflanzen hemmt. Es wird sowohl das Teilungswachstum (in Zellkulturen bei $10^{-4}$ M; GROSSMANN et al., 1983) als auch das Streckungswachstum (bei Reis $10^{-7}$ M) gehemmt. Der Wirkungsmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, soll aber mit der Gibberellin-Synthese (RADEMACHER et al., 1983) und/oder der Sterolsynthese zusammenhängen (GROSSMANN et al., 1985). Mit NDA wurden auch in vivo-Versuche durchgeführt. Alle Ergebnisse sind unter (III.8.3.) beschrieben.

Detergentien: Die Wirkung von Triton und Digitonin wird im Ergebnisteil Solubilisierung (III.5.) beschrieben.

DMSO: Eine Reihe der oben beschriebenen Substanzen sind in wäßrigen Lösungsmitteln nicht oder nur schlecht löslich. Sie wurden in 16 % DMSO in entsprechender Konzentration gelöst. Die Endkonzentration im Test betrug 2 %. Bei 2 % DMSO waren die Aktivitäten aller Glucosyltransferasen gleich wie die Kontrollen. Bei höheren Konzentrationen (bis 12,5 %) trat bei den Membranenzymen eine Hemmung von 30 %, bei der löslichen GT IsU eine Steigerung von 30 % ein.

Eine sehr wichtige Rolle spielt bei all diesen Versuchen das Verhältnis der Effektormenge zum eingesetzten Probenmaterial (Protein, Lipid). Um verschiedene Versuche vergleichen zu können, sollte daher immer angegeben werden, mit welcher Menge an Membranen (ausgedrückt als Proteingehalt) gearbeitet wurde.

## 4. Charakterisierung der Produkte der Glucosyltransferasen

Auf die Schwierigkeit, bestimmte Glucosyltransferasen spezifisch aus Membranpräparationen messen zu können, wurde bereits hingewiesen. Wenn die Testbedingungen nicht selektiv genug sind, können verschiedene Enzyme arbeiten, die unter Umständen in derselben Membran sitzen. Diese Gefahr ist deshalb nicht von der Hand zu weisen, weil das Substrat (z. B. UDPG) von einer Reihe von Enzymen benützt wird. UDPG ist Substrat bei verschiedenen Glucan-, Glycan-, Glycoprotein und Glycolipid-Syntheseleistungen. Eine Charakterisierung der in vitro gebildeten Produkte muß deshalb in jedem Fall durchgeführt werden. Im Idealfall sollte in einem bestimmten Testansatz nur ein einziges Produkt synthetisiert werden. Zur Charakterisierung der Produkte - wie auch von Zellwandbestandteilen - stehen verschiedene Methoden zur Verfügung.

### 4.1. Löslichkeitseigenschaften

Tab. 14: Löslichkeit der Glucosyltransferase-Produkte in verschiedenen Lösungsmitteln. Löslich gewordener Produktanteil in %, bezogen auf die Kontrolle. Die Kontrolle wurde in gleicher Weise mit Ethanol 70 % behandelt. Die Produkte wurden durch Zentrifugation (Z) oder Filtration (F) (II.10.1.) aufgearbeitet. Als Enzymquelle dienten Gesamtmembranfraktionen bzw. mit Ammoniumsulfat gefälltes Protein bei GT IsU.

| | | GT IU | GT IG | GT IG + GDP Man | GT IIU | GT IsU |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $H_2O$ | F | 32 | 23 | 20 | 24 | 39 |
| | Z | 55 | 40 | 43 | 37 | 66 |
| KOH 4 % | F | 39 | 52 | 42 | 78 | 86 |
| | Z | 47 | 79 | 57 | 95 | 98 |
| KOH 24 % | F | 84 | 76 | 64 | 86 | 81 |
| | Z | 88 | 85 | 79 | 98 | 98 |
| DMSO 100 % | F | 0 | 0 | 0 | 90 | 0 |
| | Z | 36 | 18 | 16 | 95 | 12 |
| TCA 5 % | F | - | - | - | - | 11 |
| | Z | 41 | 40 | 42 | 46 | 35 |

Alle Produkte waren teilweise wasserlöslich. Die Löslichkeit wurde in KOH noch erhöht. Es gab nur geringe KOH(24 %)-unlösliche Produktanteile, die am höchsten bei GT IG mit und ohne GDP-Man waren. Das Produkt der GT IIU war völlig DMSO-löslich, die der anderen Enzyme dagegen nicht oder nur wenig. Die Löslichkeit des Produktes in TCA war bei GT IsU am niedrigsten. Es gab auch Unterschiede zwischen den beiden angewendeten Methoden. Bei der Zentrifugation wurden höhere Werte erzielt. Dies kann damit zusammenhängen, daß bei der Zentrifugation unspezifische Verluste größer sind, oder aber daß gelöstes Material am Filter adsorbiert. Die Löslichkeit des Produktes der GT IsU wurde durch SDS erhöht. Eine Waschung dieses Produktes mit Chloroform-Methanol führte im Höchstfall zu einem Verlust von 15 %.

## 4.2. Stabilität der Produkte

### 4.2.1. Säurestabilität

Die Ethanol(70 %)-unlöslichen Produkte wurden auf ihre Stabilität unter hydrolytischen Bedingungen geprüft. Nach dem Abstoppen des Tests mit TCA (5 %) werden die Produkte 1 min gekocht. Alle Produkte überstehen auch längere Inkubationszeiten (getestet bis 5 min). Inkubiert man dagegen 4 h bei 100 °C mit 2 N TFA, so werden alle Produkte partiell hydrolysiert. Tab. 15 gibt die Verteilung der markierten Hydrolyseprodukte nach Trennung über PC wieder.

Tab. 15: Ausbeute (%) der Hydrolyseprodukte am Start und bei Glucose nach Behandlung der Glucosyltransferase-Produkte mit TFA (2 N, 4 h, 100 °C)

| | GT IU | GT IG | GT IG + GDP-Man | GT IIU | GT IsU |
|---|---|---|---|---|---|
| Startfleck | 13 | 47 | 31 | 13 | 0 |
| Glucose | 75 | 48 | 62 | 87 | 99 |

Die Produkte von GT IG mit und ohne GDP-Man waren bei diesen Bedingungen teilweise resistent. Die anderen Produkte wurden nahezu vollständig hydrolysiert. Bei dem Material, das am Start liegenblieb, kann es sich aber durchaus um größere Abbaubruchstücke handeln. Radioaktivität wurde nur bei Glucose und am Start gefunden.

4.2.2. Stabilität in Alkali

Die in 24 % KOH gelösten Produktanteile (24 h, Zimmertemperatur) wurden ebenfalls papierchromatographisch aufgetrennt. Sie bleiben mit einer Ausnahme alle am Startfleck liegen. Das Produkt der GT IsU ist offenbar bei diesen Bedingungen instabil. Dieses Produkt wurde hinsichtlich seiner Stabilität in Alkali (ß-Elimination) noch genauer untersucht. Die Ergebnisse sind in III.6.3. dargestellt. Die Stabilität der Produkte wird auch aus den Gelfiltrationsversuchen (III.4.4.) ersichtlich.

4.3. Bindungsanalysen

4.3.1. Enzymatische Produktanalyse

Der Abbau der Produkte mit spezifischen Enzymen ist eine elegante Methode, die Produkte zu analysieren, und wird häufig angewendet (HENRY und STONE, 1982a; FÈVRE und ROUGIER, 1981; HAYASHI und MATSUDA, 1981).

Diese Methode stößt aber an ihre Grenzen, wenn keine reinen Enzymfraktionen zur Verfügung stehen. Die meisten erhältlichen Glucanase-Präparationen sind nicht spezifisch für ein einziges Substrat. Es ist daher ratsam, die Wirkungsspezifität mit bekannten Substraten zu überprüfen. Diese wiederum können aber ebenfalls verunreinigt sein. Zusätzlich sollten die Hydrolyseprodukte identifiziert werden. Kann man im PC z. B. Cellobiose nachweisen, so ist dies ein sicheres Indiz für ß-1,4-glucosidisch verknüpfte Glucosylreste im Produkt.

4.3.1.1. Spezifität der Glucanasen

Am auffälligsten ist, daß die Endo-ß-1,4-Glucanase auch ß-1,3-Glucane abbauen kann. Als Bruchstücke entstehen Struktureinheiten der ß-1,3-Glucane. In dieser Präparation ist somit eine Fremdaktivität enthalten, oder die Wirkungsspezifität dieses Enzyms ist sehr gering. Die Aktivität der ß-1,3-

Glucanasen mit Stärke war sehr schwach und stört in der Analyse nicht, da die Produkte kein α-1,4-glucosidisch verknüpfte Zucker beinhalten. Auf Cellulase wurde wegen der großen Unspezifität verzichtet. Die Verwendung von Carboxymethylcellulose führt zu besseren Ergebnissen als mit Cellulose, da sie sich gut löst. Alle drei Glucanasen konnten auch aus einem ß-Glucan, welches sowohl ß-1,3- als auch ß-1,4-Bindungen enthält, reduzierende Zucker freisetztn. Die Proteasen Trypsin und Proteinase K konnten keines der Glucane angreifen. Umgekehrt konnte auch keine Proteolyse mit den Glucanasen gefunden werden.

Tab. 16: Aktivität verschiedener Glucanasen mit Kaltsubstraten. Teilweise sind die im PC identifizierten Bruchstücke angegeben.

| Enzyme | Stärke<br>α-1,4-Glucan | Laminarin<br>ß-1,3-Glucan | Cellulose<br>ß-1,4-Glucan |
|---|---|---|---|
| α-Amylase | Glucose<br>Maltose | - | - |
| Cellulase | Glucose<br>Maltose<br>Laminaribiose | Glucose<br>- | Glucose<br>Cellobiose |
| Laminarinase | + | Glucose<br>Laminaribiose<br>u. höhere | - |
| Exo-1,3-ß-Glucanase | + | Glucose!<br>Laminaribiose<br>u. höhere | - |
| Endo-1,3-ß-Glucanase | + | Glucose<br>Laminaribiose!<br>u. höhere | - |
| Endo-1,4-ß-Glucanase | - | Glucose<br>Laminaribiose<br>u. höhere | Glucose<br>Cellobiose |

4.3.1.2. Abbau der Produkte durch hydrolytische Enzyme

Die gewaschenen Produkte wurden mit den Enzymen inkubiert und danach der Verlust an Radioaktivität im Ethanol-unlöslichen Sediment gemessen.

Tab. 17: Freisetzung von radioaktiv markierten Zuckern aus Ethanol-unlöslichen Produkten der Glucosyltransferasen durch hydrolytische Enzyme. Angabe in %, bezogen auf die Kontrolle (Inkubation mit Puffer). Als Enzymquelle dienten a) 14 K Sediment, b) Fraktionen aus linearen Saccharose-Gradienten und c) solubilisierte Enzymfraktionen (126 K Überstand). GT IsU-Produkt wurde mit Ammoniumsulfat-gefälltem Protein und der 20 % Saccharose-Fraktion aus Abb. 7 hergestellt.

| A | GT IU | | | GT IIU | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | a | b | c | a | b | c |
| | | 30 % | | | 38 % | |
| α-Amylase | 11 | - | - | 4 | - | - |
| Trypsin | 0 | 0 | - | 0 | 5 | - |
| Proteinase K | 0 | 10 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Exo-β-1,3-Glucanase | 14 | 17 | - | 84 | 93 | 80 |
| Endo-β-1,3-Glucanase | 20 | 14 | - | 0 | 37 | 0 |
| Endo-β-1,4-Glucanase | 71 | 93 | 81 | 79 | 60 | 42 |

| B | GT IG | | | GT IsU | |
|---|---|---|---|---|---|
| | a | b | c | A.sulfat | Gradient |
| | | 30 % | | | 20 % |
| α-Amylase | 0 | - | - | 0 | - |
| Trypsin | 0 | 0 | - | 98 | 89 |
| Proteinase K | - | 2 | 0 | - | 97 |
| Exo-β-1,3-Glucanase | 3 | 25 | - | 0 | 0 |
| Endo-β-1,3-Glucanase | 1 | 18 | 29 | 55 | 86 |
| Endo-β-1,4-Glucanase | 84 | 98 | 93 | 32 | 14 |

Die Werte aus der Inkubation mit α-Amylase zeigen, daß keine α-1,4-Bindungen in den Produkten auftreten. Proteinasen können nur das Produkt der GT IsU angreifen. Der Abbau ist vollständig. Bei den getesteten Glucanasen wirkt jeweils eine auf ein gegebenes Produkt besonders stark zersetzend. GT IU und GT IG bilden Produkte, die am besten von der Endo-ß-1,4-Glucanase verdaut werden. Das Produkt von GT IIU ist am empfindlichsten gegenüber der Exo-ß-1,3-Glucanase. Überraschenderweise kann die Endo-ß-1,3-Glucanase diesem Produkt wenig anhaben. Dieses Produkt wird auch zu 96 % von der Laminarinase zersetzt. Daß die Endo-ß-1,4-Glucanase ebenfalls beträchtliche Mengen an Zucker freisetzt, läßt sich mit der ungenügenden Reinheit oder Wirkungsspezifität dieses Enzyms erklären (siehe Tab. 16 und Abb. 23). Das in vitro-Produkt der GT IsU wird außer von den Proteinasen auch von der Endo-ß-1,3-Glucanase-Präparation in beträchtlichem Maße abgebaut. Von der Laminarinase wurden 31 % dieses Produktes wieder löslich. Mit einer Glucanase, die Mischglucane (ß-1,3- und ß-1,4-Bindungen) angreifen kann (HENRY und STONE, 1982a), konnte keines der Produkte aufgelöst werden. Demzufolge liegen in diesen Enzymprodukten keine Mischglucane vor, wie sie für Gräser sehr typisch sind. Eine andere ß-1,3-Glucanase und eine andere ß-1,4-Glucanase (siehe II.14.1.) untermauern die obigen Ergebnisse. Ein sehr wichtiges Ergebnis ist die Tatsache, daß sich die Produkte unabhängig von der verwendeten Enzymquelle (14 K Membransediment; Fraktionen von linearen Saccharose-Gradienten; 126 K Überstand, Digitonin solubilisiert) sehr ähnlich waren. Dies galt für alle vier Glucosyltransferasen. Das "reinste" Produkt wurde mit den Gradientenfraktionen als Enzymquelle gewonnen.

4.3.1.3. Papierchromatographie der Hydrolysefragmente

Wie in III.4.3.1. bereits dargelegt, sollte die Produktanalyse durch lytische Enzyme die Identifizierung der Hydrolysebruchstücke mit einschließen. Abb. 23 zeigt die PC-Profile des Produktes von GT IG nach Inkubation mit verschiedenen Glucanasen. Alle drei eingesetzten Enzyme können das Produkt angreifen (siehe Tab. 17), wobei die ß-1,4-Glucanase am wirkungsvollsten ist. Die PC der Hydrolyseprodukte zeigt aber, daß auch bei den ß-1,3-Glucanasen Cellobiose und nicht Laminaribiose im Chromatogramm auftaucht. Die drei Glucanasen unterscheiden sich in der Menge des freigesetzten Disaccharids verglichen mit ebenfalls meßbarer Glucose und höheren Oligomeren, die am Start liegenbleiben. Das Produkt von GT IG ist somit ein ß-1,4-Glucan. Das Vorkommen vereinzelter ß-1,3-Bindungen ist nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen, da diese Methode möglicherweise nicht empfindlich genug ist.

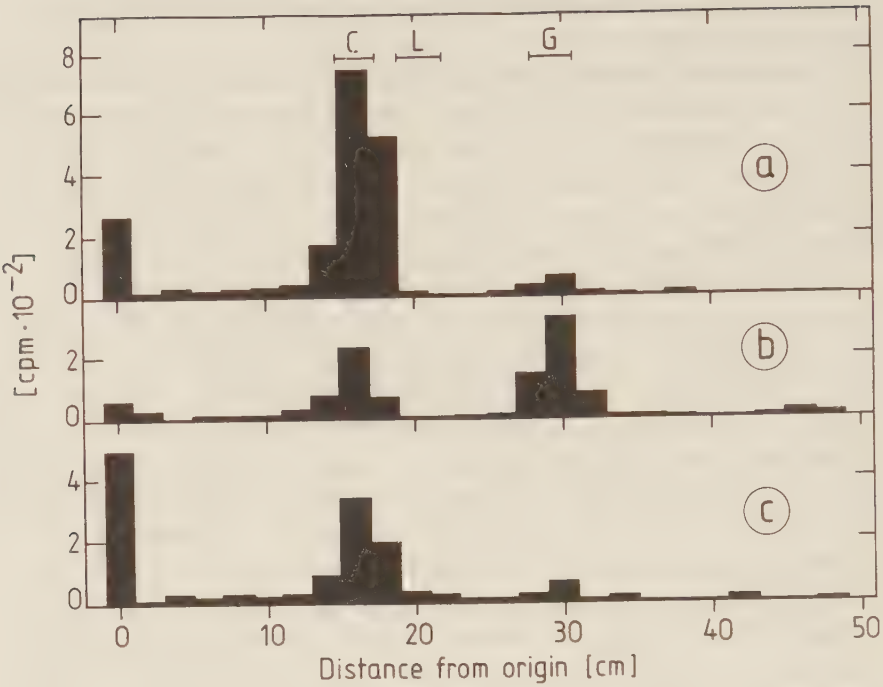


Abb. 23: PC-Profile des Produktes von GT IG nach Behandlung mit verschiedenen ß-Glucanasen. (a) Endo-ß-1,4-, (b) Exo-ß-1,3-, (c) Endo-ß-1,3-Glucanase. Als Referenzzucker wurden Cellobiose, Laminaribiose, Glucose und Mannose co-chromatographiert.

In Abb. 24 sind PC-Analysen der Produkte von GT IIU und GT IsU wiedergegeben. Das Produkt von GT IIU (a, b) wird durch die Exo-ß-1,3-Glucanase vollständig zu Glucose abgebaut. Die Endo-ß-1,4-Glucanase setzt ebenfalls Glucose, aber vor allem Laminaribiose und ein Trisaccharid frei. Das Trisaccharid wandert nicht so weit wie Cellobiose, kann aber aus Mangel an Referenzsubstanzen nicht als Laminaritriose angesprochen werden. In diesem Produkt sind ß-1,3-Bindungen dominant. Die Produkte der GT IsU sind als einzige der untersuchten Enzymprodukte Proteinase-sensitiv (c, d). Die PC-Profile lassen sich mit Hilfe der Referenzzucker jedoch nicht auswerten. Es muß davon ausgegangen werden, daß die Proteinasen nicht die Zucker-Peptid-Bindung spalten und somit an den Zuckern noch Aminosäuren hängen,

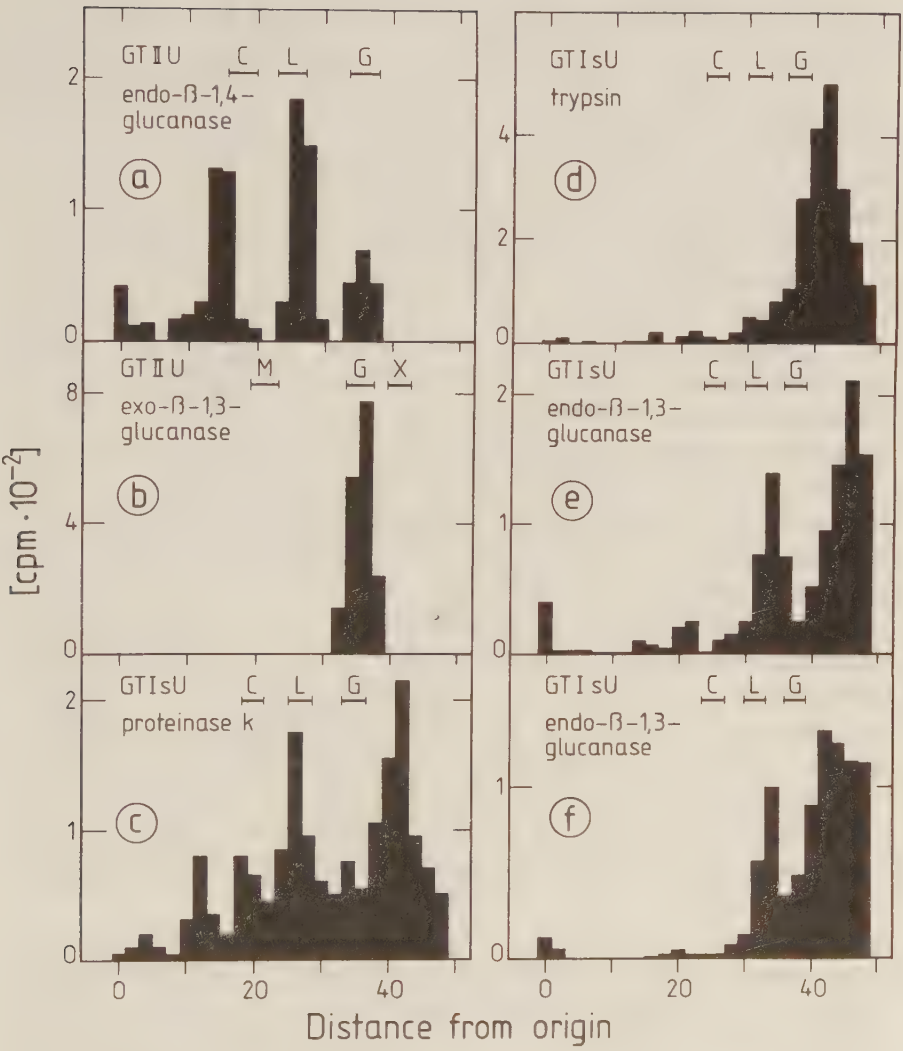


Abb. 24: PC-Profile der Produkte von GT IIU und GT IsU nach Behandlung mit ß-Glucanasen bzw. Proteinasen. Produkte in (a) und (b) wurden mit 14 K Sediment hergestellt. Produkte in (c - e) mit A.sulfat-gefälltem Protein. Produkt in (f) mit Fraktion 20 % Saccharose aus einem linearen Saccharose-Gradienten (15 h Laufzeit). Referenzzucker Cellobiose, Maltose, Laminaribiose, Glucose, Xylose.

die das Laufverhalten sehr stark beeinflussen. Alle Abbauprodukte wandern bei der Chromatographie. Man kann daraus schließen, daß die Bruchstücke nicht sehr groß sind. Es gibt sowohl bei der Proteinase K als auch bei Trypsin Bruchstücke, die weiter wandern als Glucose und eine relativ breite Verteilung aufweisen. Werden die Proben nach Protease-Behandlung mit TFA hydrolysiert und chromatographiert, findet man die gesamte Radioaktivität an der Stelle, wo der Glucosefleck liegt. Demzufolge ist der radioaktive Marker nach wie vor Glucose. Eine Umwandlung der im Test angebotenen $^{14}C$-Glucose in andere Zucker oder Zuckerderivate ist somit ausgeschlossen. Werden die Produkte von GT IsU mit Endo-ß-1,3-Glucanase behandelt, so tritt ebenfalls ein beträchtlicher Verlust im Ethanol-unlöslichen Produkt auf. Dies läßt darauf schließen, daß in diesem Produkt ß-1,3-Bindungen vorkommen. Die Exo-ß-1,3-Glucanase blieb aber unwirksam. Die PC-Profile der Hydrolysebruchstücke (e, f) sind denen der Proteinase K ähnlich. Auch in diesem Fall findet man markierte Abbaubruchstücke in einem breiten Bereich, der jenseits des Glucoseflecks liegt. Ob der Abbau auf eine ß-1,3-Glucanaseaktivität und/oder auf eine unbekannte Proteinase K-ähnliche Aktivität zurückzuführen ist, bleibt offen. Diese Enzympräparation konnte jedoch BSA nicht meßbar abbauen. Das Produkt in Abb. 24 wurde mit der Ammoniumsulfat-gefällten Enzymfraktion hergestellt, bei Abb. 24f mit der 20 % Saccharose-Fraktion des linearen Gradienten aus Abb. 7. Die PC-Profile sind gleich, was auf gleiche Produkte rückschließen läßt. Auch für die Hydrolyseprodukte des Produktes der GT IIU gilt, daß gleiche Profile erhalten werden, wenn man den Test mit Fraktion 39 % Saccharose (linearer Gradient, 15 h) durchführt. Bei der Hydrolyse des Produktes der GT IU mit der Endo-ß-1,4-Glucanase wird wie beim GT IG-Produkt Cellobiose frei (siehe Abb. 44a und c) Die Glucose in diesem Enzymprodukt ist ß-1,4-glucosidisch verknüpft.

Mit Hilfe von Digitonin gelang es die membranintegralen Glucosyltransferasen (14000g Sediment) in einen 126000g Überstand zu überführen. Werden die Produkte, die mit diesen "solubilisierten" Enzymen hergestellt wurden, mit den Glucanasen behandelt, erhält man dieselben PC-Profile, wie oben beschrieben (siehe Abb 31). Die "solubilisierten" Enzyme haben die gleiche Wirkungsspezifität wie die membranintegralen.

### 4.3.2. Methylierungsanalyse[x)]

Eine sehr sichere, aber relativ aufwendige Methode, bestimmte Bindungstypen in den Produkten nachzuweisen, ist die Methylierungsanalyse, kombiniert mit gaschromatographischer Auftrennung der Zuckerderivate. Das Prinzip soll kurz an Hand eines Glucans dargestellt werden. Durch intensive Methylierung werden alle freien Hydroxyl-Gruppen der Zuckereinheiten methyliert. Bei einem ß-1,3-Glucan entsteht das 2,4,6,-trimethyl-Derivat der Glucose bei einem ß-1,4-Glucan das 2,3,6-trimethyl-Derivat. Danach werden die Glucane hydrolysiert. Die Bindungen C1→C3 bzw. C1→C4 gehen auf, und es werden tri-O-methyl-Glucose-Einheiten frei. Diese werden reduziert und acetyliert, damit sie leicht flüchtig werden. Bei ß-1,4-Glucanen erhält man 1,4,5-tri-O-acetyl-2,3,6-tri-O-methylglucitol und bei ß-1,3-Glucanen entsprechend 1,3,5-tri-O-acetyl-2,4,6-tri-O-methylglucitol. Die verschiedenen Derivate können dann mit Hilfe der Gaschromatographie voneinander getrennt werden und über Referenzen oder Massenspektroskopie identifiziert werden. Auf diese Weise läßt sich feststellen, welche Bindungen im Glucan vorlagen. Bei kurzen Polysaccharidketten läßt sich mit dieser Methode auch eine Größenabschätzung vornehmen. Da der endständige Zucker am nicht reduzierenden Ende an vier Stellen methyliert wird, erhält man ein Tetra-O-methyl-Derivat. Der Zucker am reduzierenden Ende wird zunächst ebenfalls viermal methyliert, eine Methylgruppe wird aber gegen einen Acetylrest ausgetauscht. Aus dem Verhältnis tetra- zu tri-O-methyl-Derivaten erhält man Hinweise auf die Größe des Oligomers (BLASCHEK et al., 1983). Die Produkte wurden nach dem ursprünglichen Testverfahren mit verschiedenen Proteinfraktionen hergestellt (siehe Abb. 4 und 32). Eine Analyse der Produkte, die nach den modifizierten Testbedingungen mit Gradientenfraktionen und solubilisiertem Protein erhalten werden, war leider nicht mehr möglich.

In Abb. 25a sind die Retentionszeiten der Derivate aus ß-1,3- und ß-1,4-Glucanen aufgezeichnet. Die Derivate von endständiger Glucose liegen vor den Derivaten ß-1,3-glucosidisch verknüpfter Glucose. Die Trennung ist sehr gut, und die Spitzen lassen sich gut fraktionieren.

---

x) Die Analysen wurden freundlicherweise von Dr. W. Blaschek in Regensburg durchgeführt.

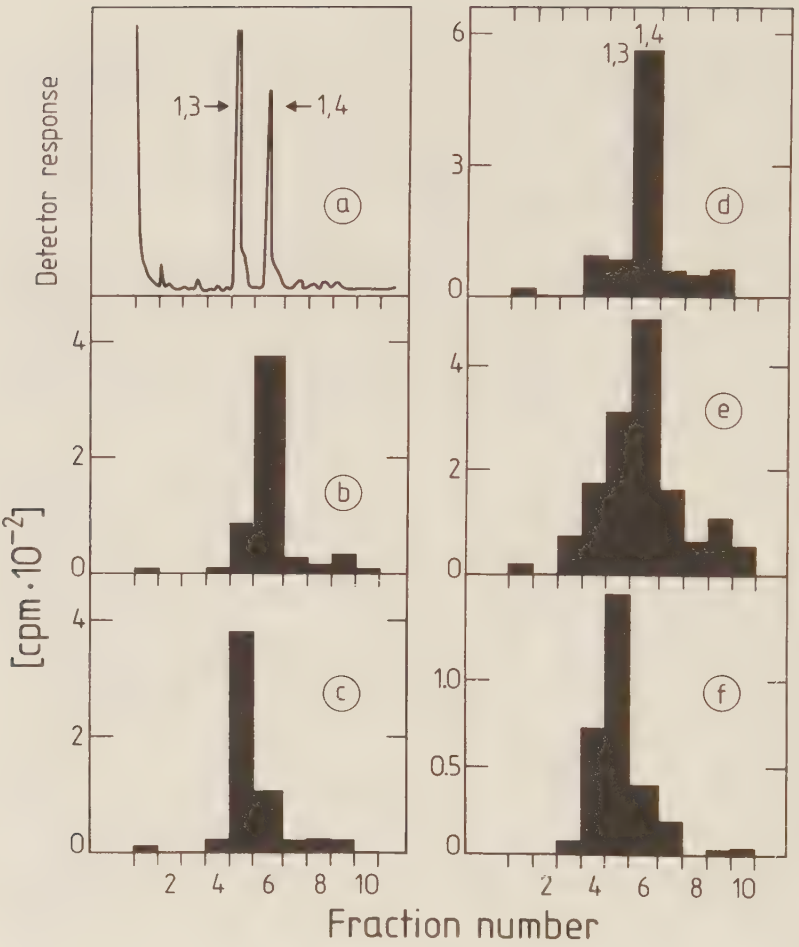


Abb. 25: Methylierungsanalyse der Glucosyltransferase-Produkte. Die acetylierten, methylierten Zuckerderivate wurden über GC getrennt. (a) Detector response (FID) der Derivate von ß-1,3- und ß-1,4-glucosidisch verknüpften Glucosylresten. (b - f) Radioaktivität in gesammelten Fraktionen der gaschromatographischen Trennung. Der Gasstrom wurde pro Fraktion 3,2 min (bei Fraktion 6 für 4 min) lang über Siliconöl-beschichtete Glaskügelchen geleitet. Die Produkte wurden nach Tab. 2 hergestellt. Als Enzymquelle wurden verwendet: (b) GT IU, Sediment zwischen 60 - 175 K; (c) GT IIU, Rohhomogenat aus $GA_3$-behandelten Zellen; (d) GT IG, Sediment zwischen 60 - 175 K; (e) GT IsU A.sulfat-gefälltes Protein (30 - 35 %); (f) GT IIsU, A.sulfat-gefälltes Protein (50 - 85 %) aus $GA_3$-behandelten Zellen.

Tab. 18: Ausbeute der meßbaren Radioaktivität in (%) in den Fraktionen der GC (Abb. 25). Die Summe aller 10 Fraktionen = 100 %

| Produkt von | Abb. 25 | terminal | Fraktion | | Verhältnis |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | ß-1,3 | ß-1,4 | ß-1,3:ß-1,4 |
| GT IU | b | 10 | 9 | 62 | 0,145 |
| GT IG | d | 1,4 | 15 | 70 | 0,21 |
| GT IIU | c | 3,7 | 64 | 18 | 3,55 |
| GT IsU | e | 11 | 21 | 33 | 0,63 |
| GT IIsU | f | 24 | 50 | 13 | 3,84 |

In keinem der Produkte ist nur ein Bindungstyp nachweisbar. Es ist immer ein gewisser Anteil des anderen vorhanden. Ob die verschiedenen Bindungen in einer Glucankette oder in verschiedenen Glucanen vorliegen, ist offen. Die ß-1,3:1,4-Glucanase (III.4.3.1.2.) konnte diese Produkte nicht hydrolysieren. Um diese Frage mit Sicherheit klären zu können, müßte man die Produkte vor der Analyse zur Homogenität reinigen.

Mit diesen Einschränkungen läßt sich feststellen: Das Produkt der GT IIU ist ein ß-1,3-Glucan. Die Produkte der GT IU und GT IG sind ß-1,4-Glucane. Im Produkt der GT IsU sind etwa 1/3 mehr ß-1,4-Bindungen als ß-1,3-Bindungen vorhanden. Dieses Produkt wurde nicht von der ß-1,4-Glucanase angegriffen. Der erhöhte Anteil in Fraktion 4 deutet darauf hin, daß die Glucanketten sehr kurz sein müssen.

Die Ergebnisse der enzymatischen Produktanalyse in Kombination mit der PC der Hydrolyseprodukte konnten mit dieser Methode abgesichert werden. GT IsU bildet allerdings eine Ausnahme auf Grund der in Punkt III.4.3.1.3. beschriebenen Schwierigkeit, die Hydrolyseprodukte zu identifizieren.

In Abb. 25f ist die Analyse des Produktes einer löslichen GT IIsU dargestellt. Dieses Enzym konnte mit Ammoniumsulfat zwischen 50 und 85 % Sättigung aus Präparationen einer $GA_3$-behandelten Zellinie ($DC_W$) ausgefällt

werden. Im Testansatz GT II mit UDP-Glucose wurde mit dieser Proteinfraktion markierte Glucose in Ethanol-unlösliches Material eingebaut. Der Einbau war temperaturabhängig (von 20 °C auf 35 °C Zunahme um 50 %) und erreichte Werte von 0,5 - 1,3 nMol eingebaute Glucose.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ Protein. Der Einbau von Glucose nahm mit der Zeit zu (getestet bis 30 min), verlief aber nicht streng linear. Das Ethanol-unlösliche Produkt wurde von der Proteinase K, der Laminarinase und der ß-1,4-Glucanase angegriffen, nicht jedoch von der α-Amylase. Bei Testansätzen, die mit TCA abgestoppt wurden, war aber keine $^{14}$C-Glucose mehr in den Waschsedimenten vorhanden. Das Produkt war demnach instabil in TCA (5 %, 1 min, 100 °C). Die Methylierungsanalyse des Produktes (Testansatz mit Ethanol abgestoppt) zeigte, daß sowohl ß-1,3- als auch einige ß-1,4-Bindungen vorhanden sind. Einen sehr hohen Anteil gab es in Fraktion 4. Es könnte sein, daß Disaccharide in einer TCA-labilen Bindung an einen Akzeptor (Protein?) gebunden sind. Diese Enzymaktivität wurde nicht weiter charakterisiert. Der hohe Anteil an ß-1,3-Bindungen könnte einen Zusammenhang mit der membranintegralen GT IIU andeuten.

Zusammenfassung: Die Produkte der verschiedenen Glucosyltransferasen sind sehr verschieden. Neben ß-1,4-Glucanen (GT IU, GT IG) und ß-1,3-Glucanen (GT IIU) gibt es auch ein Glucoprotein (GT IsU). Es gibt keinen zwingenden Beleg dafür, daß es sich bei den ß-1,4-Glucanen um Cellulose handelt. Mit dem Ausgangstestsystem werden in den verschiedenen Ansätzen mehr als ein Bindungstyp gebildet. Die Reinheit der Produkte wird verbessert durch Verwendung des modifizierten Testsystems und Membranpräparationen, die über lineare Saccharosegradienten aufgetrennt wurden.

## 4.4. Größe der Produkte

Die Größe ist ein wichtiges Kriterium bei der Beschreibung der in vitro-Produkte. Der Polymerisierungsgrad der Glucanketten läßt sich bei kurzen Glucanen mit Hilfe der Methylierungsanalyse abschätzen. Bei langen Ketten versagt diese Methode jedoch, da der Anteil an terminaler Glucose immer kleiner wird, und das Verhältnis zum Zuckeranteil in der Kette nicht mehr mit genügender Sicherheit bestimmt werden kann. Über Gelfiltration kann man das Molekulargewicht bestimmen. Durch Division des ermittelten Molekulargewichts mit dem Molekulargewicht des Bausteins Glucose gelangt man ebenfalls zum "degree of polymerisation" (DP). In Abb. 26 sind die Elutionsprofile der in KOH löslichen Produktanteile (siehe Tab. 14) nach Trennung

über eine Sephadex G-75 Säule (1 x 25 cm) wiedergegeben. Die Eluierung wurde mit 0,2 N NaOH durchgeführt, um die Löslichkeit der Produkte zu gewährleisten. Versuche mit Puffer (Tris-Mes 10 mM, pH 7,2 und Borat 10 mM, pH 9,8) brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Für Sephadex G-75 wird vom Hersteller ein Fraktionsbereich von 3.000 - 70.000 für Peptide und globuläre Proteine angegeben. Für Dextrane gilt ein Trennbereich von 1.000 - 50.000. Als Referenz zur Bestimmung des Ausschlußvolumens diente Dextran blue (MG 2.000.000). Mit K-Bichromat wurde getestet, wann niedermolekulare Substanzen eluiert werden. Das genaue Molekulargewicht (MG) konnte mit dieser Säule allerdings nicht bestimmt werden. Es werden jeweils Produkte, die mit Membranfraktionen hergestellt wurden, mit solchen von solubilisierten Enzymen (siehe III.5.3.2.) verglichen.

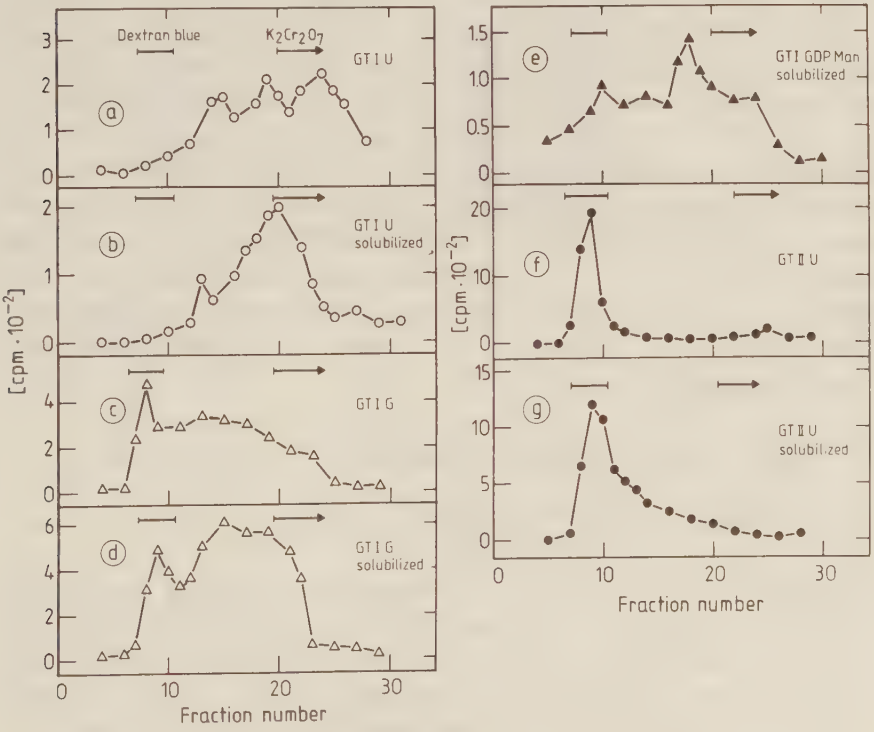


Abb. 26: Gelfiltration der 24 % KOH-löslichen Produktanteile der Glycosyltransferasen über Sephadex G-75. (a, c, f) Produkte von membrangebundenen Glycosyltransferasen. (b, d, e, g) Produkte von solubilisierten Glycosyltransferasen. Als Anhaltspunkte für den Trennbereich dienten Dextran blue und K-bichromat. Die Elution erfolgte mit NaOH (0,2 M). Fraktion à 1 ml.

Die Produkte von membranintegralen und solubilisierten Enzymen haben sehr ähnliche Elutionsprofile. Das Produkt der GT IU wird im Bereich von K-Bichromat eluiert. Erste Anteile tauchen aber schon in früheren Fraktionen auf. Mit Dextran blue wird nichts co-eluiert. Teile des Produktes werden bei einer Sephadex G-50-Säule im Ausschlußvolumen (MG 10000) eluiert. Das Produkt ist sehr heterogen. Die Größe der Produkte von GT IU erstreckt sich somit von MG $\leq$ 1000 - 10000. Das Produkt der GT IG spaltet in zwei Klassen auf. Ein Anteil mit einem MG $\geq$ 50000 und einen Anteil mit breitem Größenspektrum (1000 - 50000). Das Verhältnis der beiden Größenklassen ist beim solubilisierten Enzym zugunsten der niedermolekularen Anteile verschoben. Wird unter den Bedingungen der GT I radioaktiv markierte GDP-$^{14}$C-Mannose als Substrat eingesetzt, so wird ebenfalls ein Produkt gebildet (siehe III.7.), welches hauptsächlich vor K-Bichromat eluiert wird und demnach etwas größer als MG 1000 sein dürfte. GT IIU bildet ein Glucan, das $\geq$ 50000 ist. Mit diesen Angaben lassen sich folgende Polymerisationsgrade (Anzahl der Glucoseeinheiten) abschätzen. GT IU: 5 - 10, eventuell auch größer; GT IG: $\sim$ 250 und 10 - 250; GT GDP-Man: heterogen zwischen 6 bis etwa 250; GT IIU: >250. Das Produkt von GT IsU hat ein MG >70000 (siehe III.6.5.). Es handelt sich aber um ein Glucoprotein. Die Länge der Oligosaccharidseitenketten ist unbekannt, dürfte aber sehr kurz sein (siehe III.4.3.1.3.). Die Sequenzen an markierter, d. h. neu eingebauter Glucose, könnten aber viel kürzer sein, wenn die Monomere an bereits existierende Glycanketten angehängt werden, wie es BLASCHEK et al. (1983) in Membranfraktionen von Nicotiana tabacum nachweisen konnten.

## 5. Solubilisierung der Glucosyltransferasen

### 5.1. Vorversuche

Verschiedene Detergentien wurden in Vorversuchen hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Enzymaktivitäten und der Fähigkeit, Protein zu solubilisieren, getestet. Aus Abb. 27a wird ersichtlich, daß alle Maßnahmen zu einer Solubilisierung von Protein führten. Am wirkungsvollsten war die Kombination Triton (0,1 %)/KCl (0,5 M). Salzlösung allein (NaCl 1 M) konnte über 50 % des Gesamtproteins in Lösung bringen. Auch nach Pufferbehandlung erschien ein Teil des Proteins (20 %) im löslichen (126 K) Überstand, was damit zu erklären ist, daß die Membranproben zuvor nicht gewaschen wurden und bei 175000g auch große, nicht membrangebundenen Proteine sedimentieren können. Die Auswirkungen auf die Aktivität der Glucosyltransferasen IU und IIU

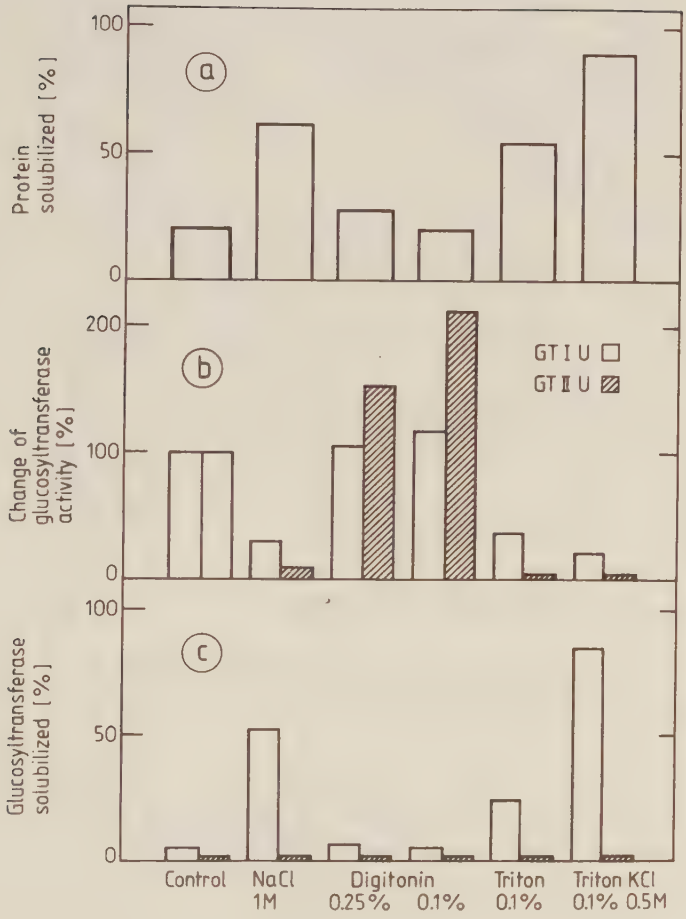


Abb. 27: Wirkung von NaCl (1 M), Digitonin (2,5 und 1 $mg.ml^{-1}$), Triton (0,1 %) und Triton/KCl (0,1 %, 0,5 M) auf die (a) Solubilisierung vom Membranprotein, (b) Aktivität der Glucosyltransferasen im Membran-Detergens-Gemisch, (c) Solubilisierung aktiver Glucosyltransferasen. Als Membranprobe diente ein 1,2 - 175 K Sediment (5,2 mg Protein.$ml^{-1}$). Nach Inkubation mit den Detergentien wurden die löslichen Überstände durch Zentrifugation 60 min x $126000g_{av}$ gewonnen. Die Glucosyltransferasen GT IU und GT IIU wurden nach Tab. 2 gemessen.

(Abb. 27b) waren sehr unterschiedlich. Digitonin, das in diesen Konzentrationen (0,25 und 0,1 %) nicht sehr gut Protein solubilisiert, steigerte die Enzymaktivitäten. Durch Triton X 100 (0,1 %) wurden beide Enzyme dagegen drastisch gehemmt. Die Ausbeute an solubilisierter, aktiver GT IU, bezogen auf die Membran-Detergentien-Gemische, war mit Triton zwar recht gut, die absolut meßbaren cpm waren aber durch die Hemmwirkung sehr gering. Bei einer Konzentrationsabhängigkeit blieb die GT IU zwischen 0,001 und 0,1 % Triton unbeeinflußt. Bei 0,5 % ergab sich eine Hemmung von 50 %. Die GT IIU wurde bereits bei 0,025 % um 70 % gehemmt. Die Proteinkonzentration war allerdings höher als bei diesem Versuch und betrug im Membran-Triton-Gemisch 4 $mg.ml^{-1}$. Mit dem GT IIU-Testansatz läßt sich keine Enzymaktivität im 126 K Überstand nachweisen. Bei der gelösten GT IU-Aktivität (getestet unter den ursprünglichen Testbedingungen) dürfte es sich um das Enzym GT IsU handeln (siehe III.6.). Triton X 100 ist wegen der inaktivierenden Wirkung in diesen Konzentrationen als Solubilisierungsmittel für die Glucosyltransferasen ungeeignet. Ebenfalls ausgeschlossen wurden Triton X 114 (0,5 %), Tween 80 (0,5 %), Ultraschall und Octylglycosid (1 %). Mit NaCl und Digitonin wurde weitergearbeitet.

5.2. Waschung der Membranen mit Salzlösung

Durch Salzbehandlung solubilisierbare Proteine gelten allgemein als membranassoziiert. Integrale Membranproteine lösen sich bei dieser Behandlung nicht. Durch NaCl lassen sich über 50 % des Gesamtproteins aus Membransedimenten in Lösung bringen (Abb. 27a und 28a). Allerdings werden die Glucosyltransferasen IU und IIU mit steigender Salzkonzentration gehemmt, wobei GT IIU empfindlicher ist. Zu 50 % gehemmt wird GT IIU bei 125 mM NaCl, GT IU bei einer Konzentration von 375 mM. Die meßbare GT IU-Aktivität steigt im 126000g Überstand von 100 cpm in der Kontrolle auf 242 cpm schon bei niedrigen Salzkonzentrationen (125 mM). Die GT IIU-Aktivität erscheint nicht im löslichen Überstand. NaCl eignet sich bei relativ geringen Konzentrationen die GT IU (ursprüngliche Testbedingungen) in Lösung zu bringen.

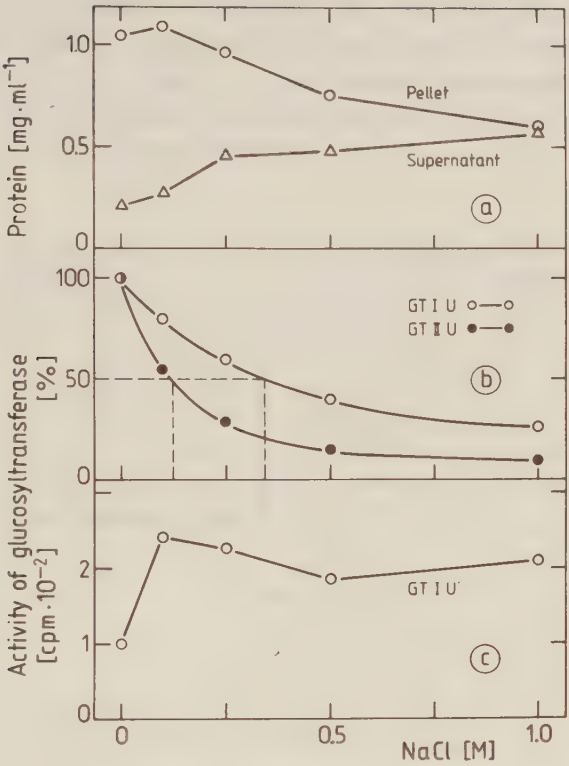


Abb. 28: Behandlung einer Membranfraktion (1,2 - 60 K, 2,6 mg Protein.ml$^{-1}$) mit NaCl. Membranen wurden langsam mit NaCl-Lösung versetzt (1:1) und weitere 45 min bei 4 °C gerührt. Glucosyltransferase-Test nach Tab. 2. (a) Protein im löslichen Oberstand (126 K) und Sediment nach der Salzbehandlung, (b) Aktivitätsverlust von GT IU und GT IIU durch NaCl in der Gesamtfraktion, (c) Aktivität von GT IU im 126 K Oberstand nach NaCl-Behandlung.

## 5.3. Behandlung der Membranen mit Digitonin

### 5.3.1. Auswirkungen auf die Glucosyltransferase-Aktivität

Sowohl GT IU als auch GT IIU zeigen gegenüber Digitonin ein Optimumsverhalten, das bei GT IIU ausgeprägter ist. In Konzentrationen, bei denen wenig Protein solubilisiert wird, werden die Enzyme aktiviert. Bei höheren Kon-

zentrationen wird die solubilisierende Wirkung besser, die Enzymaktivitäten aber gehemmt. Die GT IsU, gemessen mit Ammoniumsulfat-gefälltem Protein (membranfrei) bleibt von Digitonin dagegen unbeeinflußt. Die Ausbildung eines Optimums der Enzymaktivitäten GT IU und GT IIU kann dadurch erklärt werden, daß bei gewissen Digitonin/Membran-Verhältnissen das Substrat besseren Zugang zum aktiven Zentrum der Enzyme erhält.

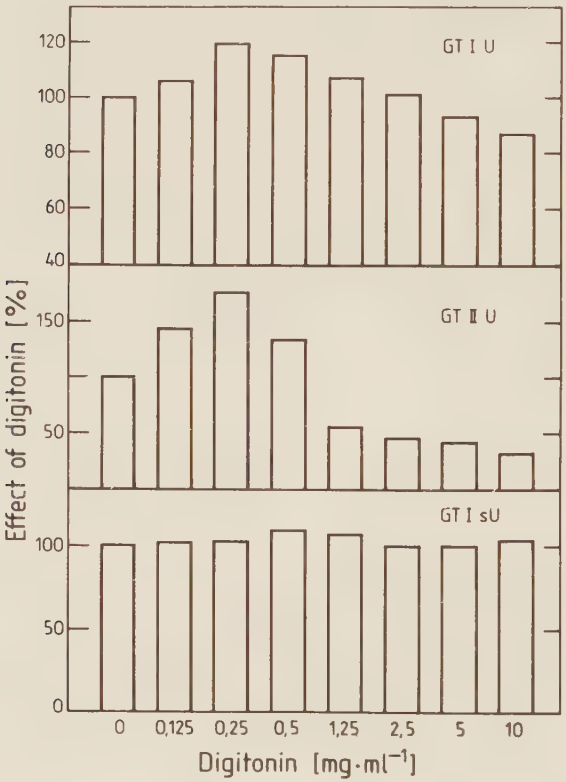


Abb. 29: Effekt von Digitonin auf die Glucosyltransferase-Aktivitäten. Glucosyltransferase-Test nach Tab. 2. GT IU und GT IIU mit Sediment zwischen 1,2 - 175 K (7 mg Protein.ml$^{-1}$), GT IsU mit A.sulfat(30 - 40 %)-gefälltem Protein (0,8 mg.ml$^{-1}$). Proteinproben wurden 1:1 mit Digitoninlösung versetzt.

5.3.2. Solubilisierung der Glucosyltransferasen

Mit Digitonin konnten alle gemessenen Glucosyltransferasen von einem 15000 g Sediment in einen 126000g Überstand überführt werden. Die Ausbeute an "solubilisierten" Enzymen lag bei 20 - 40 %. In Tab. 19 sind die Ergebnisse einiger Einzelversuche wiedergegeben.

Tab. 19: Solubilisierung der Glycosyltransferasen. Ausbeute der Enzymaktivität im 126 K Überstand in %, bezogen auf das Membran-Digitonin-Gemisch. Membranfraktionen (6 - 8 mg Protein.ml$^{-1}$) wurden 1:1 mit Digitonin-Puffer-Suspension (20 mg.ml$^{-1}$) versetzt. Versuch 1 - 4

| | | GT IU | GT IG | GT GDP-Man | GT IsU | GT IIU | Protein |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Membran-Digitonin-Gemisch | | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 126000g Überstand | V1 | 36 | 39 | 45 | 46 | 48 | 61 |
| | V2 | 23 | 23 | - | 64 | 29 | 51 |
| | V3 | 35 | 31 | - | 40 | 37 | 61 |
| | V4 | 28 | 33 | - | 77 | 45 | 63 |

Die GT IsU ließ sich noch besser lösen bei Verwendung eines Digitonin/KCl-Gemisches, was bei den anderen Enzymen jedoch keine Verbesserung brachte. Von größerer Wichtigkeit als die prozentuale Ausbeute im löslichen Überstand sind die absoluten Werte der Radioaktivitätsmessung. Nur wenn genügend cpm vorhanden sind, lassen sich die Enzyme weiteruntersuchen. Durch die Behandlung der Membranproben mit Detergentien erhöhte sich die Menge an meßbarem Protein. Dies führt zu gewissen Einschränkungen bei der Berechnung der spezifischen Aktivitäten. Die Enzyme wurden bei der verwendeten Digitoninkonzentration um 20 - 40 % gehemmt.

Die Proben der verschiedenen Versuche waren nach der Digitonin-Behandlung unterschiedlich lange auf Eis. Es zeichnete sich ab, daß die solubilisierten Enzyme nicht so stabil waren wie die membrangebundenen. Die spezifischen Aktivitäten in der Gesamtfraktion und der löslichen Fraktion lagen

aber in vergleichbaren Größenordnungen. Nur bei GT IsU wurden in der solubilisierten Fraktion höhere Werte gemessen.

Tab. 20: Spezifische Aktivitäten (pMole eingebauter Zucker. $min^{-1}.mg^{-1}$ Protein) der Glycosyltransferasen im Membran-Digitonin-Gemisch und im solubilisierten 126 K Überstand. Die Proteinkonzentration in der Membran-Digitonin-Mischung betrug im Versuch 1: 3,8; V2: 2,8; V3: 3,6; V4: 4,0 mg pro ml.

| | | GT IU | GT IG | GT GDP-Man | GT IsU | GT IIU |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Membran- | V1 | 2,85 | 165 | 6,06 | 1,96 | 2713 |
| Digitonin- | V2 | 2,66 | 136 | - | 2,7 | 1683 |
| Gemisch | V3 | 2,70 | 160 | - | 1,96 | 1300 |
| | V4 | 2,70 | 123 | - | - | 2133 |
| 126000g | V1 | 1,78 | 121 | 7,03 | 3,35 | 2696 |
| Überstand | V2 | 1,53 | 70 | - | 1,71 | 1030 |
| | V3 | 1,45 | 86 | - | 3,15 | 866 |
| | V4 | 2,50 | 123 | - | - | 2065 |

## 5.4. Trennung der solubilisierten Enzyme über Molekularsiebe

Die Trennung der solubilisierten Proteinfraktionen über eine Sephadex G-75-Säule (1 x 25 cm) sollte Hinweise auf die Größe der Proteine geben. Leider war die GT IIU (30 min Testzeit) nach der Elution nicht mehr aktiv. Die GT IU, GT IG und GT IsU wurden im Ausschlußvolumen wiedergefunden. Ihr Molekulargewicht ist demnach größer als 70000. Ovalbumin (MG 43000) wurde in den Fraktionen 10 - 16 mit dem Maximum in Fraktion 14/15 eluiert. Nach einer Trennung der Proteinfraktion über AcA 34 war auch die GT IG-Aktivität nicht mehr nachweisbar. Die Stabilität der solubilisierten Enzyme scheint die Ursache dafür zu sein. Die GT IsU ist das stabilste der vier Enzyme. Sie ließ sich auch in eluierten Fraktionen der AcA 34 Säule messen (Abb. 38).

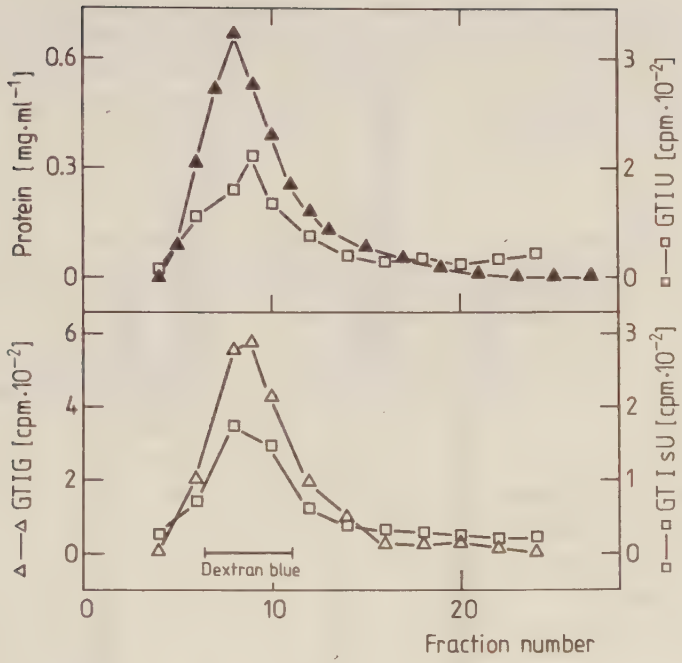


Abb. 30: Gelfiltration der solubilisierten Glucosyltransferasen über Sephadex G-75; Fraktion à 1 ml. Eluiert wurde mit Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7.2. (a) Protein (▲-▲) und GT IU (□-□). (b) GT IG (△-△) und GT IsU (□-□). Für die Solubilisierung wurde ein 14 K Sediment verwendet. Der Enzymtest erfolgte nach dem modifizierten Schema (Tab. 3) aus den Fraktionen für 5 min (GT IG), 10 min (GT IsU) und 15 min (GT IU).

## 5.5. Charakterisierung der Enzymprodukte

Eine wichtige Frage ist, ob die Enzyme nach der Solubilisierung noch das gleiche Produkt bilden. In Abb. 26 wurde bereits die Größe der Produkte von membranintegralen und solubilisierten Enzymen verglichen. Es stellte sich heraus, daß sich mit den Produkten von den solubilisierten Enzymen bei Tendenzen zu niedrigeren Molekulargewichten, ähnliche Elutionsprofile ergaben wie mit Produkten hergestellt mit Membranfraktionen. Die Enzyme bilden immer längerwerdende Glucanketten. Eine Beeinflussung dieser Kettenverlängerung bei Enzymen, die aus ihrer normalen Lipidumgebung heraus

gelöst sind, kann man sich leicht vorstellen. Wie sieht es aber mit der Bindung aus über die verschiedene Zucker verknüpft werden? Bleibt diese Spezifität bestehen? Die Stabilität gegenüber Hydrolasen und die PC-Profile der mit Endo-ß-1,4-Glucanase behandelten Produkte geben auf diese Frage die Antwort.

Tab. 21: Freigesetzter Anteil in (%) der Produkte der Glycosyltransferasen von solubilisierten Enzymen durch verschiedene Hydrolasen. Die Produkte wurden nach Tab. 3 bei verlängerten Testzeiten hergestellt.

| | GT IU 15 min | GT IG 5 min | GT IIU 30 min | GT GDP-Man 15 min |
|---|---|---|---|---|
| Endo-ß-1,4-Glucanase | 71 | 93 | 50 | 93 |
| Endo-ß-1,3-Glucanase | - | 29 | 0 | - |
| Exo-ß-1,3-Glucanase | - | - | 80 | - |
| Proteinase K | 0 | 0 | 0 | 0 |

Die Produkte sind in gleichem Maße durch die selben Hydrolasen angreifbar, wie die Produkte von Membran-gebundenen Enzymen (siehe Tab. 17). Die Löslichkeit aller vier Enzymprodukte in KOH (24 %) ist größer 90 % und ist damit etwas besser als bei den Produkten der membranintegralen Enzyme. Die gelösten Produkte wurden über Sephadex G-75 gelfiltriert (Abb. 26).

Die PC-Profile der Hydrolysefragmente von Produkten der solubilisierten Enzyme gleichen exakt denen von Produkten, die mit Membranenzymen gebildet wurden (siehe Abb. 31 und 44). Die Produkte von GT IU und GT IG sind ß-1,4-Glucane, wie durch das Vorkommen von Cellobiose und das Fehlen von Laminaribiose belegt wird. Beim Produkt von GT IIU dagegen fehlt Cellobiose, und es taucht Laminaribiose und ein Trisaccharid auf. Das Hydrolyseprodukt der Exo-ß-1,3-Glucanase ist einzig und allein Glucose. Hier liegt demnach ein ß-1,3-Glucan vor. In allen Fällen gibt es auch Glucose als Hydrolyseprodukt, was die Identifikation als Glucane zuläßt.

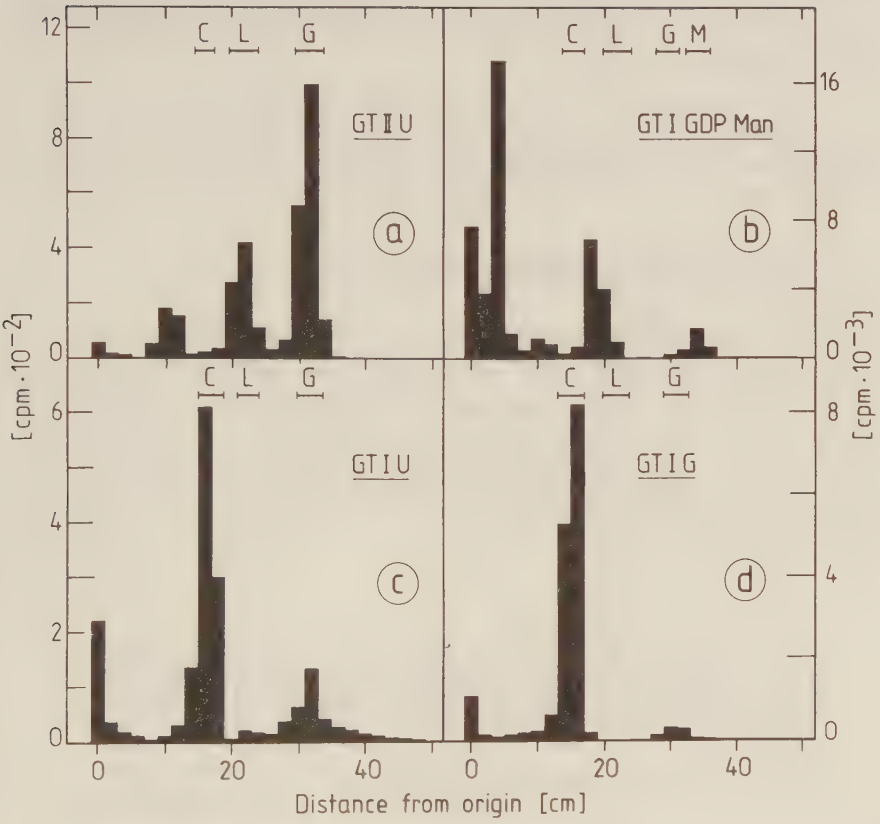


Abb. 31: Analyse der Glucosyltransferase-Produkte hergestellt mit solubilisierten Enzymen. PC-Profil der Abbaubruchstücke nach Inkubation mit ß-1,4-Endo-Glucanase. Die Produkte wurden nach dem modifizierten Ansatz (Tab. 3) hergestellt. (a,c,d) Glucosyltransferasen II und I mit UDPG bzw. GDPG als Substrat. (b) Testansatz I mit GDP-Mannose als Substrat. Die Balken repräsentieren die Lage der Referenzen. C = Cellobiose, L = Laminaribiose, G = Glucose, M = Mannose.

Die Endo-ß-1,4-Glucanase baut auch ein Produkt ab, das gebildet wird, wenn man GDP-Mannose an Stelle der Glucose-Nukleotide im GT I-Test anbietet. Das PC-Profil entspricht nicht dem der anderen Enzyme. Als monomerer Baustein kann Mannose angegeben werden. Bei den Disacchariden liegt der Substanzfleck zwischen Cellobiose und Laminaribiose. Am Start und kurz danach

bleibt der Hauptteil der Hydrolyseprodukte liegen. Di- und Oligomere aus Mannoseeinheiten standen als Referenzen leider nicht zur Verfügung. (Vergleiche dazu auch Abb. 45).

Von der allgemeinen Charakterisierung der Glucosyltransferasen und deren Produkte lassen sich verschiedene Punkte abkoppeln. Sie werden im folgenden gesondert betrachtet.

6. Die lösliche Glucosyltransferase GT IsU

Schon bei ersten Aufarbeitungen konnte mit dem ursprünglichen Testansatz für die GT IU eine Enzymaktivität aus hochtourigen Überständen oder aus "overlay"-Fraktionen von linearen Gradienten gemessen werden. Diese spontan lösliche Glucosyltransferase wurde als GT IsU bezeichnet. Ihre Aktivität ließ sich durch Optimierung der Testbedingungen erheblich steigern (Tab. 22). Das Produkt blieb in allen Fällen abbaubar durch Proteinase K und der Endo-ß-1,3-Glucanase.

Tab. 22: Spezifische Aktivität der GT IsU (pMole eingebaute Glucose.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ Protein) bei verschiedenen Testbedingungen. Proteinquelle: Ammoniumsulfat-Fraktion 28 - 38 %

| Temperatur ($^{o}C$) | Salz (mM) | pMole.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ | Steigerungsfaktor |
|---|---|---|---|
| 25 | $MgSO_4$ 60 | 8,46 | 1 |
| 40 | $MgSO_4$ 60 | 12,12 | 1,4 |
| 40 | $MnCl_2$ 10 | 20,57 | 2,4 |
| 40 | $ZnCl_2$ 1 | 24,76 | 2,9 |

Die Charakterisierung ergab, daß sich dieses Enzym aber grundsätzlich von der bekannten "Glucansynthetase" GT IU unterschied. Diese Enzymaktivität war aber auch immer in sedimentierbaren Membran-Fraktionen enthalten. Sogar in einer Fraktion, welche zwischen 100 K und 175 K sedimentierte, war sie vertreten. Der Anteil des Enzyms im löslichen Überstand konnte durch Salz/

Detergentien-Behandlung der Membranen erhöht werden. Diese enzymatische Aktivität wird im folgenden näher untersucht.

6.1. Ammoniumsulfat-Fällung

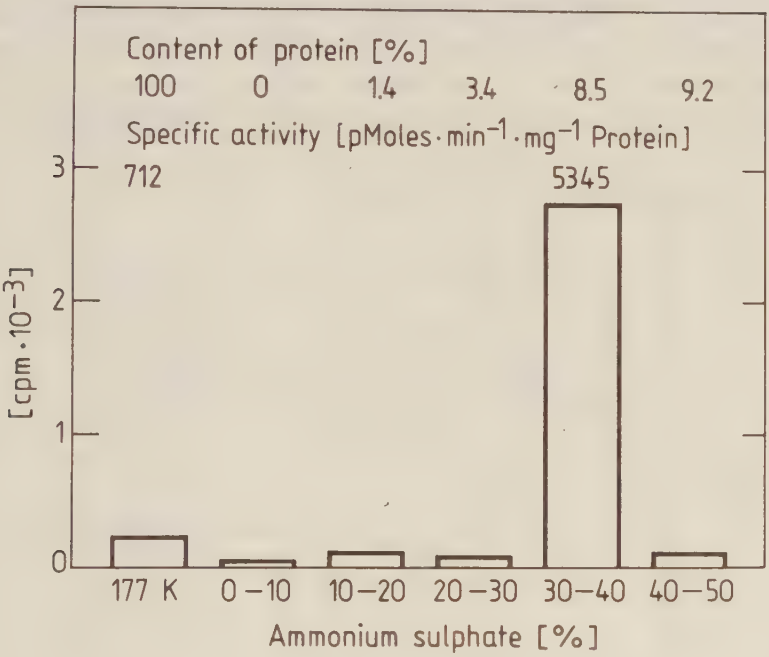


Abb. 32: Fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung von GT IsU. Als Proteinquelle diente ein 177000g Überstand. Testbedingungen: 25 °C, 5 min, $MgCl_2$ 60 mM.

Da es sich um gelöstes Protein handelt, war eine fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung möglich. Überstände von 175000g-Zentrifugationen wurden mit Ammoniumsulfat versetzt und die gefällten Proteine resuspendiert. Die gesamte Enzymaktivität ließ sich zwischen 30 - 40 % Ammoniumsulfat fällen. Dabei stieg die spezifische Aktivität um den Faktor 7,5. Vom gesamten Protein waren in diesem Bereich 8,5 % fällbar. Der Bereich konnte sogar noch auf 30 - 35 % eingegrenzt werden. Der Sicherheit wegen wurden die Fällungen aber zwischen 28 - 38 % durchgeführt. Auch die durch NaCl "solubilisierte" Enzymaktivität ließ sich in diesem Bereich ausfällen. In fast

allen Versuchen, die der Charakterisierung dieses Enzyms dienten, wurde mit Ammoniumsulfat gefälltem Protein gearbeitet.

6.2. Zeitabhängigkeit bei verschiedenen Testbedingungen

Wurde das Enzym in Anwesenheit von $MgCl_2$ bei 25 °C (ursprünglicher Testansatz) gemessen, sank der Betrag an eingebauter $^{14}C$-Glucose bei längeren Inkubationszeiten wieder ab. Dies bedeutet, daß bereits eingebaute Glucose wieder löslich wurde, sei es allein oder zusammen mit Teilen des Akzeptors.

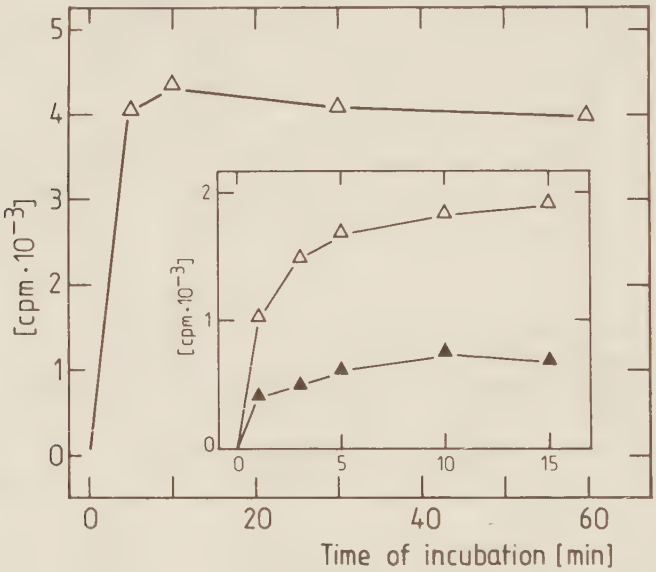


Abb. 33: Zeitabhängigkeit der GT IsU-Aktivität mit A.sulfat-gefälltem Protein. Testbedingungen: 24 µg Protein, 40 °C, $ZnCl_2$ (1 mM); der ganze Testansatz wurde auf Papier aufgetragen und chromatographiert. Die Radioaktivität im Startfleck repräsentiert das Produkt. Nebenbild: Kinetik ohne (▲-▲) und mit $ZnCl_2$ (△-△), 24 µg Protein, 40 °C. Diese Produkte wurden gewaschen und in Toluol gezählt.

In Anwesenheit von $ZnCl_2$ im Test blieb das während der Reaktion gebildete Produkt stabil. Auch nach 60 min fand keine nennenswerte Auflösung des Ethanol-unlöslichen Produktes in Ethanol-lösliche Bestandteile statt. Im Nebenbild der Abb. 33 ist der Unterschied zwischen der Enzymaktivität mit

und ohne $ZnCl_2$ bei verschiedenen Testzeiten dargestellt. Mit $ZnCl_2$ ist die Einbaugeschwindigkeit höher. Ebenso wird bei gleicher Menge an Enzym mehr Glucose eingebaut bis zum Erreichen der Sättigung, obwohl die beiden Kurven einen ähnlichen Verlauf haben. Der Zeitraum, in dem ein linearer Einbau der Glucose abläuft, wird durch $ZnCl_2$ nicht erhöht. Auch nachträgliche Zugabe von UDPG kann die Reaktion nicht wieder anstoßen. Das Substrat ist daher nicht der limitierende Faktor.

6.3. ß-Eliminierung

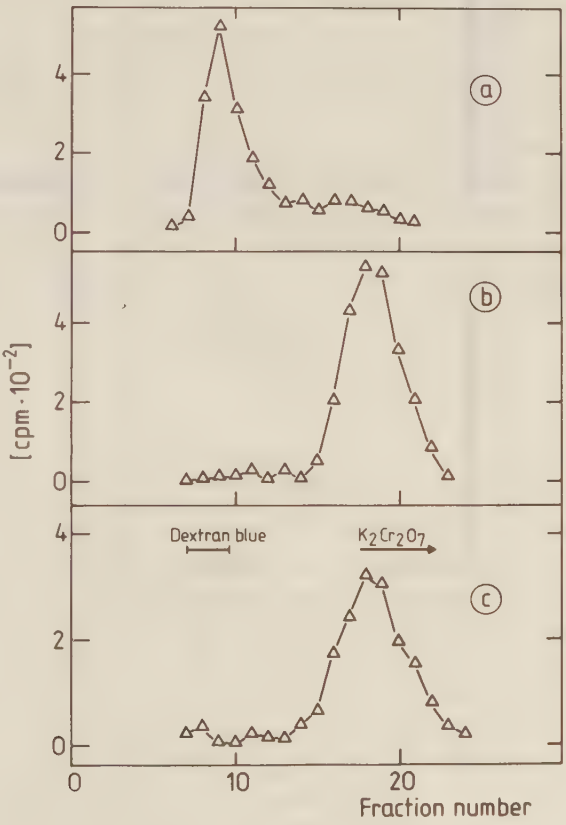


Abb. 34:
Gelfiltration des Produktes von GT IsU über Sephadex G-75. (a) unbehandeltes Produkt. (b) Produkt mit Proteinase K inkubiert. (c) Produkt mit ß-1,3-Endo-Glucanase inkubiert. Die Proben wurden in Borat-Puffer aufgenommen und auf die Säule aufgebracht. Die Elution erfolgte mit Borat 10 mM, KCl 100 mM, pH 9,8; Fraktion à 1 ml. Die Produkte wurden mit Ammoniumsulfat - gefälltem Protein hergestellt.

Die Produktanalyse mit hydrolytischen Enzymen (siehe III.4.3.1.) ergab, daß die in Ethanol-unlösliches Produkt eingebaute Glucose durch Einwirkung von

Proteinase und Endo-ß-1,3-Glucanase wieder Ethanol-löslich wurde (Abb. 34). Die Glucose wird demzufolge an ein Protein gebunden. Glycoproteine spielen in Eu- und Prokaryonten eine große Rolle und haben die unterschiedlichsten Funktionen (Obersichtsartikel von LAMPORT, 1980).

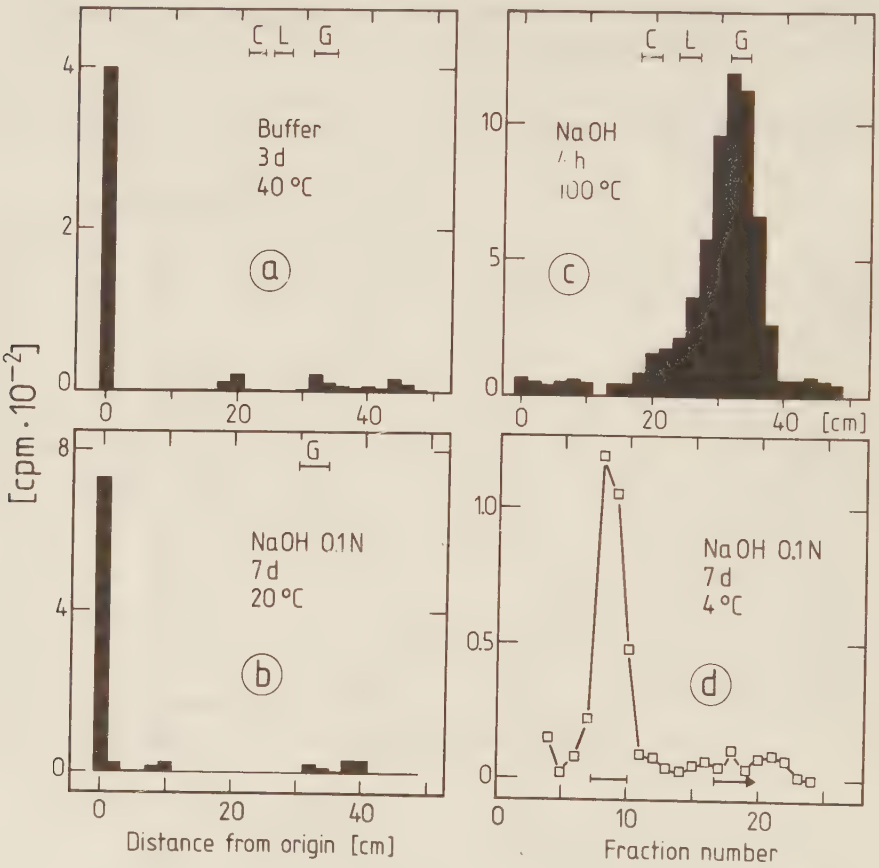


Abb. 35: NaOH-Behandlung (ß-Eliminierung) des Produktes von GT IsU. Die Produkte wurden mit Ammoniumsulfat-gefälltem Protein hergestellt. Testbedingungen: 5 min, 40 °C, $ZnCl_2$ 1 mM. Das Produkt (Ethanol 70 %-unlöslich) wurde mit Puffer bzw. NaOH inkubiert. Nach der Inkubation wurde der gesamte Ansatz chromatographiert. (a, b, c) über Papier (28 h in IEW), (d) über Molekularsieb Sephadex G-75 eluiert mit NaOH (0,2 N). Referenzzucker: C = Cellobiose, L = Laminaribiose, G = Glucose. Der Balken entspricht Dextran blue; der Pfeil steht für K-Bichromat.

Zwei Typen der Bindung zwischen Zucker und Peptid kommen hauptsächlich vor. Sie unterscheiden sich unter anderem in ihrer Stabilität gegenüber Alkali. N-glycosidische Bindungen zwischen N-Acetylglucosamin und Asparagin sind in schwachen Alkalilösungen stabil. Die meisten O-glycosidische Bindungen überstehen diese Behandlung nicht. Bei dieser Art der Bindung sind die Aminosäuren Serin, Threonin, Hydroxyprolin und z. B. die Zucker Galaktose, Arabinose, Xylose beteiligt.

Das Produkt der GT IsU wurde mit starker und schwacher Alkalilösung inkubiert und anschließend über PC oder Sephadex G-75 getrennt. Die milde Alkalibehandlung führt zum selben Ergebnis wie die Inkubation mit Puffer. Das Produkt bleibt bei der PC am Startfleck liegen (Abb. 35a,b). Daß es sich hierbei nicht um größere Bruchstücke, sondern um das intakte Glucoprotein handelt, zeigt Abb. 35d. Das radioaktiv markierte Produkt wird auch nach NaOH-Behandlung ebenso wie das unbehandelte Produkt mit dem Ausschlußvolumen eluiert. Das Molekulargewicht ist >70000. Wird die Inkubation dagegen mit 2,5 N NaOH durchgeführt (4 h, 100 $^{o}$C) tritt ein Abbau des Produktes auf. Die Abbaubruchstücke nach der PC liegen in breiter Verteilung um Glucose. Nach diesen Kriterien handelt es sich um eine N-glycosidische Bindung.

6.4. Protease-Labilität

In Abb. 24 wurde bereits die Sensitivität des Produktes der GT IsU gegenüber Proteasen aufgezeigt. Das Produkt war in allen Versuchen durch Proteinase K abbaubar. Daran änderten weder die unterschiedlichen Testbedingungen etwas (Tab. 22) noch die Verwendung unterschiedlicher Enzymquellen (Tab. 17). Es schien keine Verlängerung der Oligosaccharidseitenketten bei optimierten Testbedingungen stattzufinden. Ab einer bestimmten Größe wären diese Oligoglucanketten Ethanol-unlöslich, und man würde durch Protease-Behandlung keinen Verlust an eingebauter Glucose in Ethanol-unlösliches Material mehr feststellen können, da die Hydrolyseprodukte ebenfalls unlöslich wären.

Wird Produkt von GT IsU bei unterschiedlich langen Testzeiten hergestellt und danach mit Proteinase K behandelt, so ergibt sich im PC-Profil der Hydrolyseprodukte ein auffälliger Unterschied. Die Anzahl der radioaktiv markierten Flecken bleibt zwar gleich, ihre RG(x 100)-Werte sind aber verschieden. Dies gilt besonders für die Hydrolysebruchstücke, die weiter als

Glucose wandern. Beim Produkt der 20 min Inkubation (Glucoseeinbau ist abgeschlossen) liegt dieser Substanzfleck viel näher an Glucose als bei 2 min Inkubationszeit (linearer Bereich). Die RG-Werte der drei Flecken sind bei 2 min 127,78,30, bei 7 min 123,80,36 und bei 20 min 109,72,33. Möglich wäre, daß bei längeren Inkubationszeiten der Glucosylierungsgrad eines bestimmten Peptidabschnitts erhöht wird. Dies würde dadurch erfolgen, daß immer mehr Glucosylreste einzeln oder in Ketten von 2 - 4 Einheiten gebunden werden. Dadurch würde sich das Wanderverhalten der Glucopeptid-Bruchstücke ändern. Es könnte aber auch eine Umformung, gleich welcher Art, des zunächst gebildeten Produktes erfolgen.

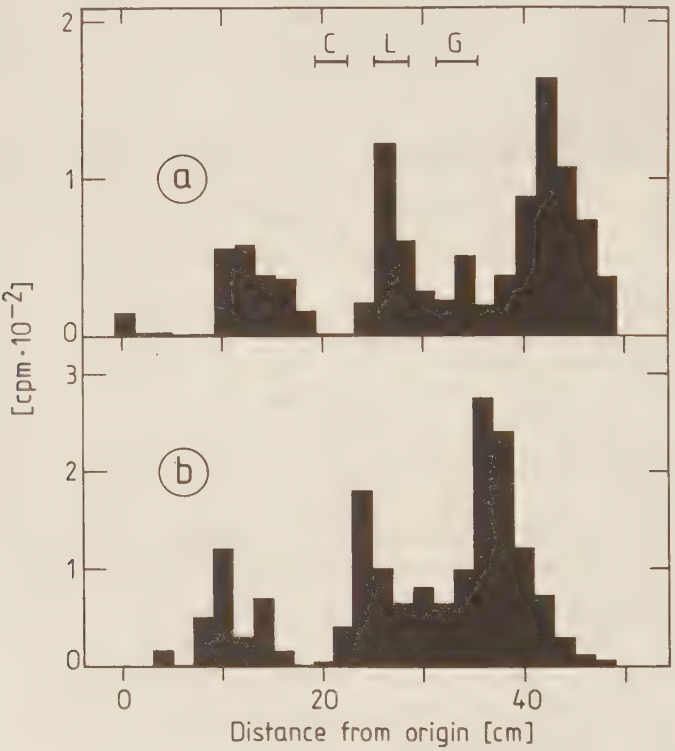


Abb. 36: PC-Profil des Produktes von GT IsU nach Behandlung mit Proteinase K. Die Produkte wurden mit A.sulfat-gefälltem Protein (40 °C, $ZnCl_2$) hergestellt, gewaschen und mit Proteinase K (0,1 $mg.ml^{-1}$, 4 h, 22 °C) behandelt. Die löslich gewordenen (Ethanol 70 %) Bruchstücke wurden chromatographiert. Inkubationszeit bei der Produktherstellung (a) 2 min, (b) 20 min. C = Cellobiose, L = Laminaribiose, G = Glucose.

## 6.5. Größe von Enzym und Produkt

Das gewaschene Ethanol-unlösliche Produkt durchläuft eine Sephadex G-75-Säule ungehindert und wird in den gleichen Fraktionen wie Dextran blue eluiert. Durch die Behandlung des Produktes mit Proteinase K oder Endo-ß-1,3-Glucanase entstehen Bruchstücke, die an der unteren Ausschlußgrenze dieses Molekularsiebs liegen. Sie ist für Proteine mit 3000 angegeben. Daß die Glucanase das Produkt ebenfalls zerlegt, ist erstaunlich. Mit einer unbekannten Fremdaktivität in dieser Enzympräparation muß gerechnet werden. Das Molekulargewicht des Produktes ist >70000.

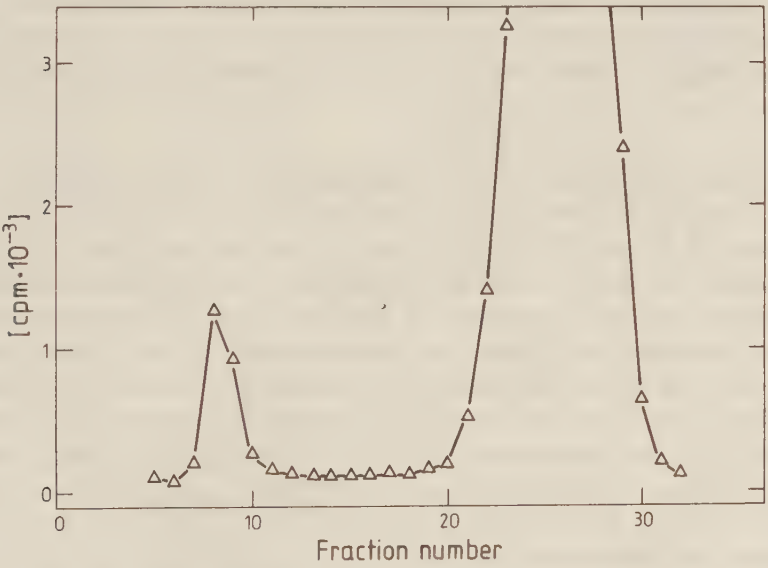


Abb. 37: Gelfiltration über Sephadex G-75 des gesamten Testansatzes von GT IsU. Die Elution erfolgte mit Tris-Mes 10 mM, KCl 5 mM, pH 7,2. Fraktionen à 1 ml wurden gesammelt. Von jeder Fraktion wurde ein Aliquot (0,1 ml) zur Messung der Radioaktivität verwendet.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann das Produkt der GT IsU als ein Glucoprotein angesprochen werden. Die Glucosylreste sind einzeln oder in Einheiten von wenigen Glucosemolekülen an das Peptid oder bereits vorhandene Glycosylreste gebunden. Die Reaktion findet auch mit teilgereinigten

Proteinfraktionen statt. Es erhebt sich die Frage, wer der Akzeptor der Glucosylierungsreaktion ist. Werden die Glucosylreste an das Enzym selbst gebunden oder an ein anderes Peptid?

In Abb. 30b wurde gezeigt, daß die GT IsU ungehindert eine Sephadex G-75-Säule passieren kann. Auch das glucosylierte, gewaschene Produkt wird im Ausschlußvolumen eluiert (Abb. 35d). Dies kann man sich für eine Trennung von Produkt und Substrat zu Nutze machen, ohne daß man den Test durch denaturierende Maßnahmen abstoppen muß. Der gesamte Testansatz wird dazu auf die Säule aufgetragen. Das Produkt befand sich in den Fraktionen 7 - 10. Das restliche Substrat (UDP-Gluc) sowie andere niedermolekulare Substanzen wurden in den Fraktionen 20 - 35 eluiert (Abb. 37). Schwierigkeiten, die beim Wiederlösen des gefällten Produktes auftraten, konnten so umgangen werden.

Das radioaktiv markierte Produkt (Fraktionen 7 - 10 der Sephadex G-75-Säule; Abb. 37), wurde auf ein weiteres Molekularsieb aufgetragen. Der Trennbereich für AcA 34 wird für globuläre Proteine mit 20000 - 350000 angegeben. In Abb. 38 sind die Elutionsprofile der GT IsU-Enzymaktivität (a) und des gebildeten Produktes (b) dargestellt. Das Aktivitätsmaximum der GT IsU liegt deutlich getrennt vom Proteinmaximum, ist aber relativ breit verteilt. Das Enzym wird teilweise mit Dextran blue eluiert. Die Ausbeute lag allerdings nur bei 50 % der aufgetragenen Gesamtaktivität. Katalase (MG 232000) wird erst später eluiert. Die Elution von Ferritin (MG 440000) beginnt schon etwas eher als die von GT IsU. Die Größe von GT IsU liegt somit im Bereich von 300000 bis 350000. Proteinproben, die mit Hilfe von Digitonin aus Membranfraktionen solubilisiert wurden, wurden ebenfalls über AcA 34 getrennt. Nur die GT IsU und GT IU konnten nach der Trennung in den Fraktionen nachgewiesen werden. GT IG und GT IIU waren inaktiv. Das Profil der solubilisierten GT IsU (und auch GT IU) entsprach dem der spontan gelösten und mit Ammoniumsulfat gefällten in Abb. 38a. Das Maximum lag an der gleichen Stelle bei allerdings breiterer Verteilung. Bei der Enzymaktivität, die hier unter den Testbedingungen der GT IU gemessen wurde, könnte es sich ebenfalls um GT IsU handeln, da dieses Enzym auch unter den Testbedingungen für GT IU aktiv ist (siehe dazu Abb. 7).

Das Maximum des Produktes liegt an derselben Stelle wie das der Enzymaktivität. Ein zweites Maximum taucht bei niedrigen Molekulargewichten auf, wo auch K-Bichromat eluiert wird. Hierbei kann es sich um Kontamination

durch mitgeschlepptes Substrat, um Abbauprodukte oder um niedermolekulare Akzeptorstücke handeln. Die breite Verteilung, sowie die Schulter in der abfallenden Flanke zeigen, daß das Produkt nicht sehr einheitlich ist. Möglicherweise finden während der Aufarbeitung Aggregations- und/oder Dissoziationsprozesse statt.

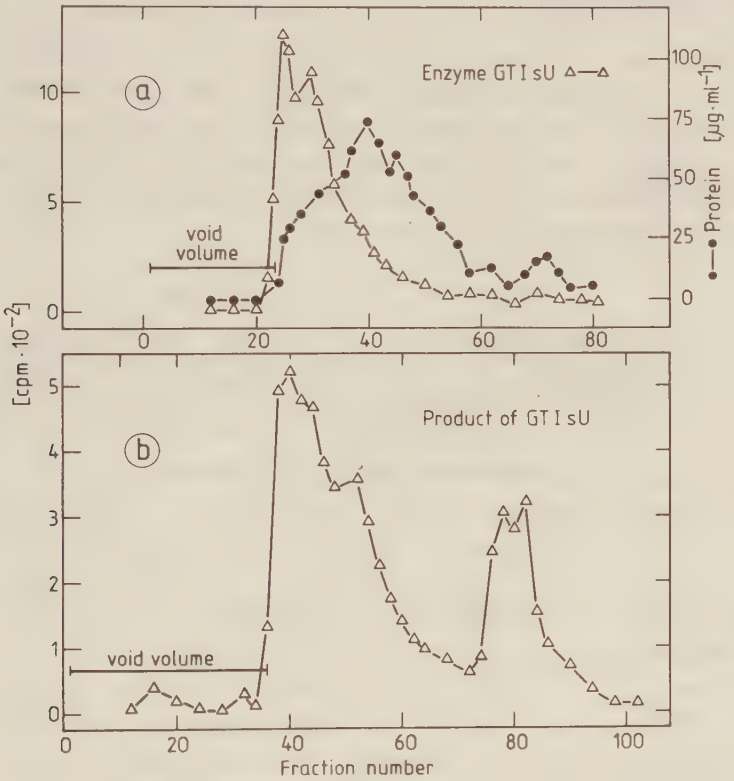


Abb. 38: Elutionsprofile einer AcA 34-Säule. (a) Protein der A.sulfat-Fällung (30 - 35 %) eines 177 K Überstandes wurde auf die Säule aufgetragen (10,8 mg); gemessen wurden das Protein (● - ●) und die GT IsU-Aktivität (40 °C, 5 min, $ZnCl_2$) in den Fraktionen. (b) Produkt von GT IsU (Fraktionen 7 - 10 der Sephadex G-75-Säule aus Abb. 37) wurden aufgetrennt. Die Radioaktivität der ganzen Fraktion wurde in Unisolve gemessen. Die Säulen wurden mit Tris-Mes 10 mM, KCl 10 mM, pH 7,2 eluiert: Fraktionen à 2 ml wurden gesammelt. Zwischen der Durchführung der beiden Versuche wurde die Säule neu gepackt. Mit Dextran blue wurde das Ausschlußvolumen bestimmt.

Das Produkt scheint dieselbe Größe zu haben wie das Enzym selbst. Daß es sich um ein und dasselbe Protein handelt, ist zwar angesichts der Reinigungsschritte wahrscheinlich, auf Grund der vorliegenden Daten aber nicht bewiesen.

6.6. Reinigung der GT IsU

Verschiedene Aufarbeitungsschritte zur Isolierung der GT IsU wurden durchgeführt. Auf Grund der Löslichkeit konnte dieses Enzym leicht von den membrangebundenen Glucosyltransferasen getrennt werden. Auch andere Proteine wurden abgetrennt, was sich in der Erhöhung des Reinheitsgrades niederschlägt. In Tab. 23 sind die spezifischen Aktivitäten der GT IsU aus verschiedenen Proteinfraktionen aufgelistet.

Tab. 23: Spezifische Aktivität der GT IsU. (pMole eingebaute Glucose.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ Protein) Test bei 40 °C mit $ZnCl_2$. a) Membrananreicherung, b) Isolierung von gelöstem Protein. Stellvertretend sind die Ergebnisse aus zwei Einzelversuchen dargestellt.

| Proteinquelle | (pMole.$min^{-1}$.$mg^{-1}$) | Proteinquelle | (pMole.$min^{-1}$.$mg^{-1}$) |
|---|---|---|---|
| a) | | b) | |
| Rohhomogenat | 1,2 | Rohhomogenat | 1,2 |
| 1,2 K Überstand | 2,9 | 175 K Überstand | 1,05 |
| 15 K Sediment | 5,0 | A.sulfat 30 - 35 % | 40,6 |
| linearer Gradient | | Sephadex G-75 | 46,5 |
| 20 % Saccharose | 36 | AcA 34 | |
| | | Maximum-Fraktion | 570 |

Sowohl in Sedimentfraktionen als auch in Fraktionen von linearen Gradienten ist die spezifische Aktivität der GT IsU erhöht. Eine weit bessere Reinigung läßt sich durch Fällung des Proteins gefolgt von anschließender Entsalzung und Gelfiltration über Molekularsiebe erreichen.

6.7. Zeitabhängigkeit: Einfluß von Nukleotid-Zucker

Mögliche Auswirkungen von Alternativ- oder Zweitsubstraten auf die Enzymaktivität wurden bereits angesprochen (Punkt III.3.10). Es kann durchaus sein, daß mögliche Effekte bei Messungen im linearen Bereich der Zeitabhängigkeit noch nicht auftreten bei längeren Inkubationszeiten, die Reaktion aber gerade deshalb weiterlaufen kann, weil nun der benötigte Partner vorhanden ist.

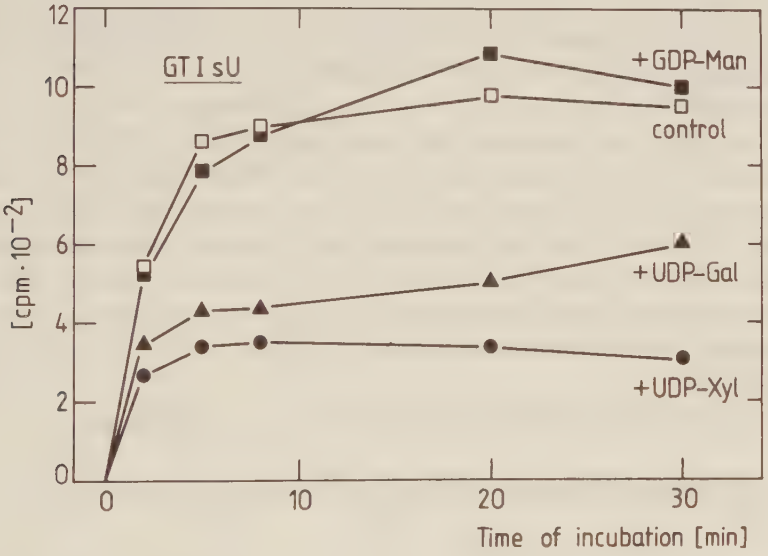


Abb. 39: Zeitabhängigkeit der Aktivität der Glucosyltransferase IsU in Anwesenheit verschiedener Konkurrenzsubstrate. Proteinquelle: Fraktion 7 des linearen Saccharose-Gradienten in Abb. 6 (15,5 % Saccharose). Die Testdurchführung erfolgte bei 40 °C in Anwesenheit von $ZnCl_2$ (1 mM) mit 8,8 µg Protein im Test. Die Konzentration der Konkurrenzsubstrate war wie die der markierten UDP-$^{14}$C-Glucose 1 µM.

Der Einbau von Glucose in Anwesenheit anderer Nukleotidzucker war nur in den ersten 2 Minuten linear. GDP-Mannose beeinflußte die Enzymaktivität nicht. Der Kurvenverlauf entsprach dem der Kontrolle. UDP-Galaktose und UDP-Xylose (siehe Abb. 20) setzten dagegen die Einbaugeschwindigkeit her-

unter, und der Einbau von Glucose kam schneller zum Erliegen. Die Reaktion brach ab. Es werden nur etwa 40 % der Kontrolle erreicht. UDP-Galaktose und UDP-Xylose zeigen die gleiche hemmende Wirkung bei Verwendung von Ammoniumsulfat-gefälltem Protein und Fraktionen aus linearen Saccharose-Gradienten.

## 7. Die Rolle von GDP-Mannose bei der Glucosyltransferase I

Neben UDP-Glucose gilt auch GDP-Glucose als mögliches Substrat für die in vitro-Synthese von ß-1,4-Glucanen. Im verwendeten System wird mit GDPG als Substrat weit mehr Glucose eingebaut als mit UDPG, wenn man Enzymfraktionen unter gleichen Bedingungen bei mikromolarer Substratkonzentration inkubiert (siehe Tab. 8). Mit beiden Substraten wird ein ß-1,4-Glucan gebildet. Bei Verwendung von GDP-Glucose bricht die Reaktion allerdings bereits nach 2 Minuten ab (Abb. 10a). Nachträgliche Zugabe von frischer GDP-Glucose vermag die Reaktion nicht wieder anzustoßen. Dies bedeutet, daß der Einbau von Glucose nicht wegen Substratmangel zum Erliegen kommt. Belegt wird dies zusätzlich dadurch, daß bei nachträglicher Zugabe von neuem Emzym wieder Glucose in Ethanol-unlösliches Produkt eingebaut wird. Die Konzentration an dem hemmenden Teilprodukt GDP ist ebenfalls zu gering, um für den totalen Einbaustopp verantwortlich zu sein (siehe Abb. 19).

### 7.1. Zeitabhängigkeit des Zuckereinbaus unter GT I-Testbedingungen

#### 7.1.1. Einfluß verschiedener Zucker-Nukleotide auf die GT IG-Aktivität

Bereits bei den Charakterisierungsversuchen (III.3.10.) wurde deutlich, daß verschiedene Zucker-Nukleotide die Glucosyltransferase-Aktivitäten beeinflussen können. Ein interessantes Ergebnis wurde mit GDP-Mannose erhalten. Bei kurzen Testzeiten (30 sec) wurde eine Hemmung, bei langen Testzeiten (5 min) eine Steigerung der GT IG festgestellt.

Die Zeitabhängigkeit erklärt dieses Ergebnis. In Anwesenheit von GDP-Man (5 µM) ist die Geschwindigkeit des Glucoseeinbaus reduziert. Die Reaktion bricht aber nicht wie in der Kontrolle bereits nach kurzer Zeit ab, sondern der Einbau läuft annähernd linear weiter. Andere Zucker-Nukleotide und niedrige Konzentrationen von GDP-Man (0,1 µM) haben dagegen keinen Einfluß auf den zeitlichen Verlauf des Glucoseeinbaus. Allerdings wird der Gesamteinbau durch UDP-GlucNac (25 %), UDP-Xylose (57 %) und UDP-Glucose (10 %) gehemmt. GDP-Mannose ist demnach ein notwendiger Faktor zur Aufrechterhaltung der GT IG-Aktivität.

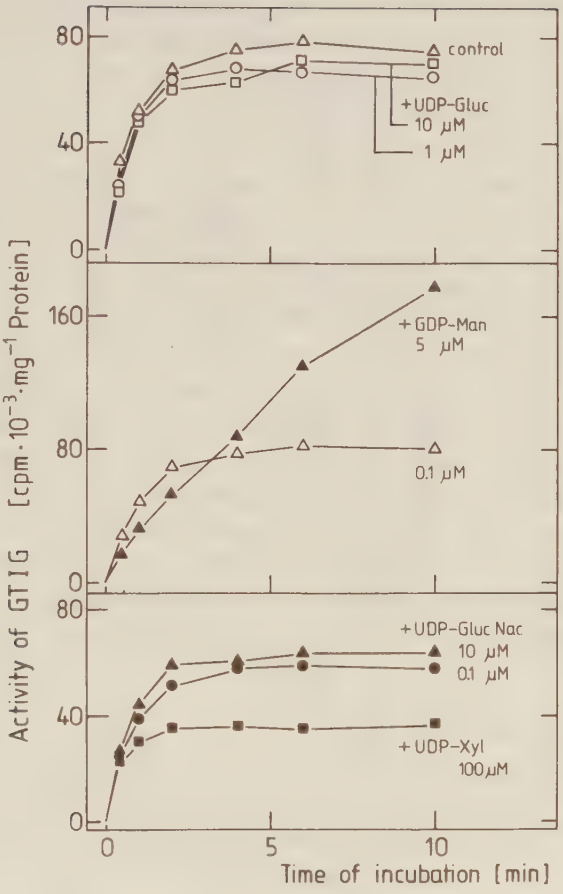


Abb. 40:
Zeitabhängigkeit der Glucosyltransferase IG aus einem 14 K Membransediment. Einfluß von verschiedenen Zucker-Nukleotiden auf den Einbau von $^{14}C$-Glucose aus GDP-$^{14}C$-Glucose (cpm.mg$^{-1}$Protein). Enzymtest nach Tab. 3.

7.1.2. GDP-Mannose-Einfluß bei Verwendung von gereinigten Enzymfraktionen

In Abb. 40 wurde der Einfluß von GDP-Mannose auf die GT IG deutlich. Als Proteinquelle diente ein Membransediment (14000g). In linearen Saccharose-Gradienten werden GT IU und GT IG bei der gleichen Dichte (ca. 30 %) akkumuliert. Abbildung 41 beantwortet die Fragen, ob sich der GDP-Mannose-Effekt auch mit diesen teilgereinigten Membranproben einstellt (Abb. 41b) und ob der Zuckereinbau durch die Glucosyltransferase IU in gleicher Weise beeinflußt wird wie bei der Glucosyltransferase IG (Abb. 41a).

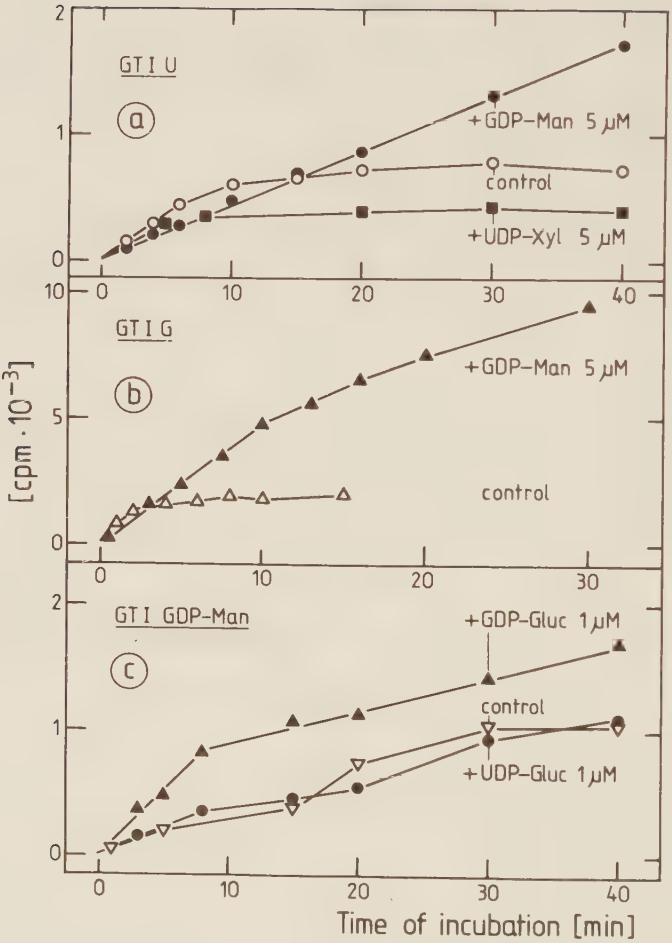


Abb. 41: Vergleich der Kinetiken von GT IU, GT IG und GT mit GDP-Mannose in Anwesenheit anderer Zucker-Nukleotide. Als Enzymquelle diente die 30 % Saccharosefraktion des linearen Gradienten, dargestellt in Abb. 7 (6,5 µg Protein im Test) für GT IU und GT IG sowie das 14 K Sediment (16,6 µg Protein im Test) für GT GDP-Man. Die Messungen wurden nach Tab. 3 durchgeführt. Im Testansatz für GT IU waren 2 µM UDP-$^{14}$C-Glucose enthalten.

Beide Fragen sind mit ja zu beantworten. Es gibt bei GT IG keinen Unterschied zu dem Ergebnis bei Verwendung von ungereinigten Membranen. Es zeigt sich zudem, daß der Glucoseeinbau in Anwesenheit von GDP-Man auch nach 30 Minuten noch nicht zum Erliegen gekommen ist. Wird an Stelle von GDPG UDPG als Substrat verwendet (GT IU), wird der gleiche Effekt sichtbar. Der Glucoseeinbau, der in der Kontrolle nach etwa 10 min abbricht, läuft in Anwesenheit von GDP-Man bis 40 min linear weiter. Auch in diesem Fall ist die Einbaugeschwindigkeit geringer als in der Kontrolle. UDP-Xylose bewirkt wiederum nur eine Verminderung des Gesamteinbaus.

Es stellt sich die Frage, auf welche Weise GDP-Mannose diesen Einfluß ausübt. Findet ein Mannosyl-Transfer statt, oder geht GDP-Mannose unverändert aus der Reaktion hervor. Unter den gleichen Testbedingungen (GT I, Tab. 3) wurde GDP-$^{14}$C-Mannose (5 µM) mit Membranproben (14 K Sediment) inkubiert. Abb. 41c zeigt, daß Mannose ebenfalls in ein Ethanol-unlösliches Produkt eingebaut wird. Diese enzymatische Aktivität wurde als Glycosyltransferase mit GDP-Man (GT GDP-Man) bezeichnet. Der Einbau verläuft etwa 30 Minuten lang konstant bei 16,6 µg Protein im Test. Durch Co-Inkubation mit UDPG und GDPG wurde überprüft, ob der Einbau von Mannose ebenfalls durch das zweite Substrat beeinflußt wird. Dies ist bei UDPG nicht der Fall. In Anwesenheit von GDPG dagegen ist die Einbaugeschwindigkeit in den ersten Minuten erhöht. Ab etwa 7 Minuten verlaufen die Kurven dann parallel.

Sowohl die GT IG-Aktivität durch GDP-Man, als auch die GT GDP-Man-Aktivität durch GDP-Gluc erfahren eine positive Beeinflussung. Ein Einfluß auf GT GDP-Man ist mit UDPG bei den gemessenen Inkubationszeiten nicht feststellbar, könnte aber bei längeren Testzeiten ebenfalls auftreten. Beide Zucker werden in ein (gemeinsames?) Ethanol-unlösliches Produkt eingebaut.

Die Zusammensetzung der Zucker-Nukleotide im Testansatz beeinflußt den Einbau bestimmter Zucker entscheidend. In Tab. 24 werden die Einflüsse bei Verwendung von UDPG, GDPG und GDP-Man verglichen.

GDP-Mannose stimuliert den Einbau von Glucose aus UDPG (20 %) und in stärkerem Maße aus GDPG (277 %). Der Einbau von Mannose aus GDP-Man wird nur durch GDPG (60 %) gefördert. Die Ansätze, in denen beide Substrate markiert sind, zeigen genauso viel Zuckereinbau wie die Summe der jeweiligen Einzelansätze mit nicht markierten Zweitsubstraten.

Tab. 24: Einbau von Mannose und Glucose aus Zucker-Nukleotiden. 20 µg Protein (14 K Sediment) wurde 30 min bei 25 °C mit verschiedenen Kombinationen von Zucker-Nukleotiden inkubiert. UDPG 1 µM, GDPG 1 µM, GDP-Man 5 µM. Ein Substrat war jeweils radioaktiv markiert, das zweite Substrat war unmarkiert. Der Zuckereinbau wird angegeben in cpm bei gleichem Proteineinsatz und gleichen Testbedingungen. Die Werte sind Durchschnittswerte von 3 Messungen.

| 1. Substrat markiert | 2. Substrat unmarkiert | cpm | % |
|---|---|---|---|
| 1. UDPG | - | 605 | 100 |
| 2. UDPG | GDP-Man | 718 | 118 |
| 3. GDPG | - | 2494 | 100 |
| 4. GDPG | GDP-Man | 9415 | 377 |
| 5. GDP-Man | - | 1358 | 100 |
| 6. GDP-Man | UDPG | 1324 | 97 |
| 7. GDP-Man | GDPG | 2183 | 160 |

| beide Substrate markiert | | cpm | Summe 2 + 6 | Summe 4 + 7 |
|---|---|---|---|---|
| UDPG | GDP-Man | 2016 | 2042 | - |
| GDPG | GDP-Man | 11424 | - | 11598 |

7.1.3. Zeitabhängigkeit mit solubilisierten Enzymen

Die GT IG konnte durch Behandlung mit Digitonin (Tab. 19) in einen "löslichen" Zustand gebracht werden. Das Enzym wird dadurch je nach Grad der Solubilisierung von Lipid und anderen Membranproteinen getrennt.

Auch in diesem Fall ist der GDP-Man-Effekt auf die GT IG noch vorhanden. Der Einfluß von GDP-Gluc auf GT GDP-Man ist zwar ebenfalls noch vorhanden, fällt aber nicht so sehr ins Gewicht wie bei der Verwendung von Membranfraktionen (Abb. 41c). Wird das solubilisierte Protein jedoch über Sephadex G-75 getrennt (Abb. 30), so vermag GDP-Man die GT IG, gemessen aus der Gipfelfraktion, nicht mehr zu stimulieren.

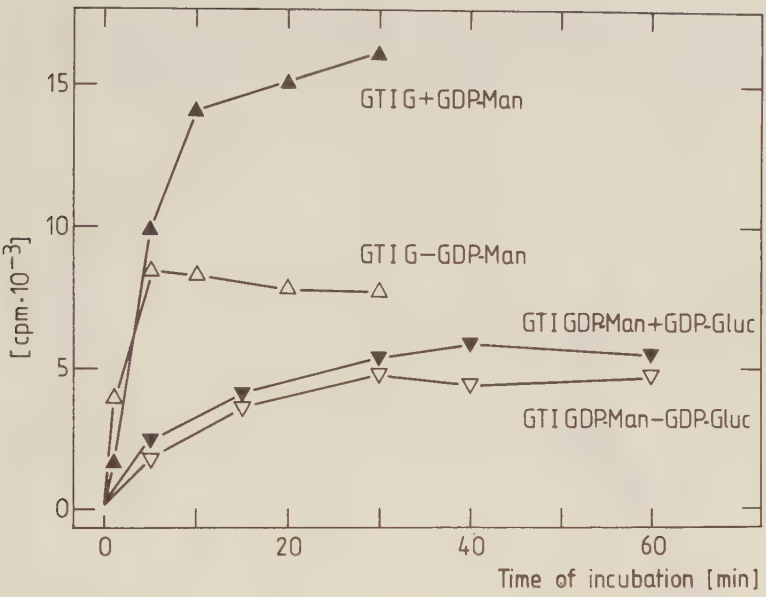


Abb. 42: Zeitabhängigkeit der Glycosyltransferasen GT IG und GT GDP-Man mit Digitonin-solubilisierten Enzymen (Proteinkonzentration im Test 86,6 µg). Einfluß von GDP-Man auf den Einbau von $^{14}$C-Glucose aus GDPG sowie der von GDP-Gluc auf den Einbau von $^{14}$C-Mannose aus GDP-Man. Test nach Tab. 3.

7.1.4. Zeitabhängigkeit der GT IG nach Vorinkubation mit GDP-Man

Wie verhält sich der Einbau von Glucose durch GT IG, wenn die Enzymproben mit GDP-Man vorinkubiert werden und somit der Mannoseeinbau bereits im Gang ist?

Der Glucoseeinbau in der Kontrolle bricht wie bekannt nach kurzer Zeit ab. Werden die Membranen mit GDP-Mannose (5 µM, 10 min) vorinkubiert, so erhält man das gleiche Bild, als wenn der Test direkt in Anwesenheit von GDP-Man gestartet wird. Wird dagegen die Reaktion mit GDP-$^{14}$C-Gluc gestartet und GDP-Man erst nach bestimmten Inkubationszeiten zugesetzt und weitere 60 sec inkubiert, so ändert sich das Bild. Die Glucansynthese bricht wie in der Kontrolle nach 2 Minuten ab. Der fördernde Einfluß von GDP-Man kann sich

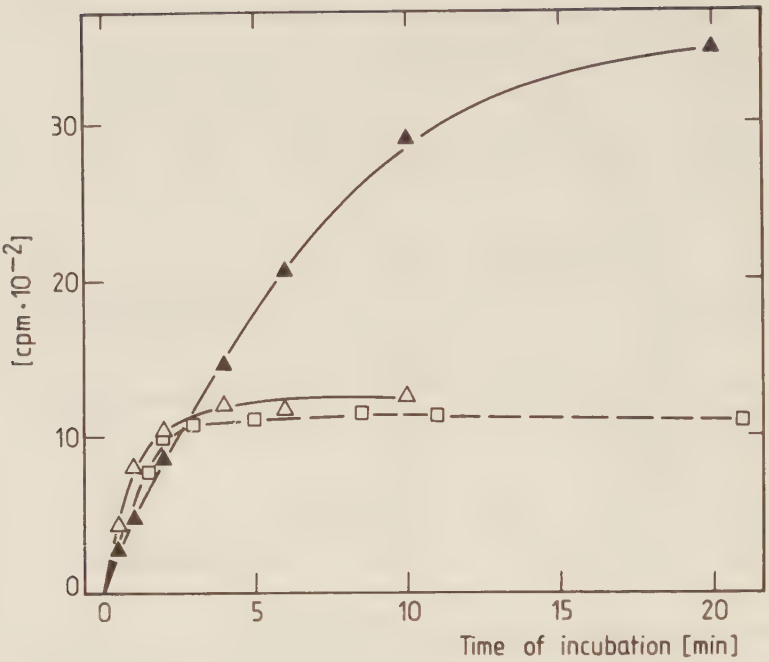


Abb. 43: Zeitabhängigkeit der Glucosyltransferase GT IG nach Vorinkubation (10 min, 25 °C) mit GDP-Man. Proteinquelle 14 K Sediment; 20 µg im Test. Δ-Δ Kontrolle, vorinkubiert mit aqua dest. ▲-▲ Vorinkubation mit GDP-Man 5 µM, □-□ Zugabe von GDP-Man während des Glucose-Einbaus. Nach 10 min Vorinkubation der Enzymproben wurde der Test durch Zugabe von Reaktionsgemisch gestartet. Nach 30 sec, 1, 2, 4, 6, 10, 20 min wurde GDP-Man (Konzentration im Test 5 µM) zugegeben und für weitere 60 sec inkubiert.

nur auswirken, wenn die Glucansynthese noch im Gange ist bzw. GDP-Man von Beginn an im Testansatz enthalten ist. Bei den Enzymproben, die mit GDP-Man vorinkubiert wurden, ist offen, ob das synthetisierte Oligomannan oder noch nicht verbrauchte GDP-Mannose für die Verlängerung der Glucansynthese verantwortlich ist.

Wie wird aber der Mannoseeinbau beeinflußt, wenn die Proben mit GDP-Gluc vorinkubiert wurden? Hierzu wurde radioaktiv markierte GDP-$^{14}$C-Mannose im Test eingesetzt.

Tab. 25: Einbau von Mannose aus GDP-Man. 50 µl Protein (50 µg, 14 K Sediment) wurden mit 20 µl Testpuffer ohne Substrat gemischt. Die beiden Substrate wurden in 10 µl Portionen zugesetzt. Testvolumen 90 µl, 25 °C, Gesamtinkubationszeit 12 min.

| Vorinkubation 6 min | | Inkubation 6 min | cpm | % |
|---|---|---|---|---|
| 1. aqua dest. | + | GDP-Man$^{x)}$ | 880 | 100 |
| 2. GDPG | + | GDP-Man$^{x)}$ | 966 | 109 |
| 3. GDP-Man$^{x)}$ | + | aqua dest. | 2075 | 235 |
| 4. GDPG$^{x)}$ | + | aqua dest | 6910 | 100 |
| 5. GDPG$^{x)}$ | + | GDP-Man | 7525 | 108 |
| 6. GDPG$^{x)}$ | + | GDP-Man$^{x)}$ | 9176 | 132 |

$^{x)}$Zucker sind radioaktiv markiert.

Die Ansätze 1 - 3 zeigen, daß der Mannoseeinbau über 12 min kontinuierlich abläuft. Werden die Proben mit GDPG vorinkubiert, ist der Mannoseeinbau gegenüber der Kontrolle leicht erhöht. Die Vorinkubation mit GDPG verhindert den Mannoseeinbau nicht. Die zweite Serie (4 - 6) bestätigt dieses Ergebnis. Aus den Kinetiken ist bekannt, daß der Glucoseeinbau aus GDPG bei 6 Minuten bereits abgebrochen ist. Der Einbau von Glucose wird durch zusätzliche Inkubation mit nichtmarkierter GDP-Man für weitere 6 Minuten nur um 8 % erhöht. Bei Zusatzinkubation mit radioaktiv markierter GDP-Man erhält man einen Wert, der 32 % über dem Kontrollwert liegt, d. h. Mannose wird weiterhin eingebaut.

## 7.2. Produkte aus GT I-Ansätzen - Einfluß von GDP-Mannose

### 7.2.1. Enzymatische Hydrolyse

In Abschnitt 7.1. wurde gezeigt, daß GDP-Mannose den Einbau von Glucose aus GDPG und UDPG positv beeinflußt. Der Einbau von Mannose wird durch GDPG ebenfalls erhöht. Die einfachste Erklärung wäre, daß ein gemeinsames Produkt aus Glucose und Mannose gebildet wird. Die beiden enzymatischen Aktivitäten, die für den Einbau der beiden Zucker verantwortlich sind, würden nur in Anwesenheit beider Substrate optimal arbeiten.

Die Produkte der GT IU und GT IG werden am besten von der Endo-ß-1,4-Glucanase abgebaut (siehe Tab. 17). Wurden die Produkte in Anwesenheit von GDP-Man hergestellt, so hatte dies keinen Einfluß auf die Abbaubarkeit durch die Glucanase. Das gleiche gilt auch, wenn UDP-Xylose im Testansatz enthalten war.

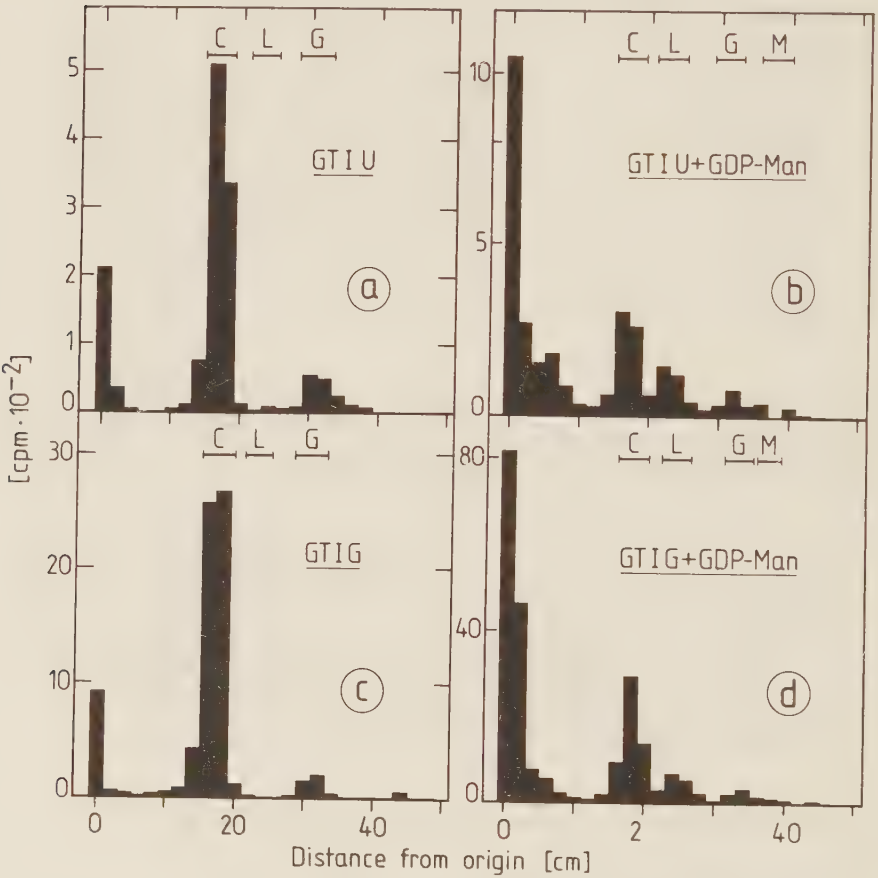


Abb. 44: Papierchromatographische Auftrennung von Ethanol-löslichen Hydrolysefragmenten der Produkte von GT IU und GT IG nach Behandlung mit ß-1,4-Endo-Glucanase. Co-chromatographiert wurden die Referenzzucker C = Cellobiose, L = Laminaribiose, G = Glucose, M = Mannose. Verglichen werden Produkte, die ohne (a und c) und mit (b und d) GDP-Man (5 µM) im Testansatz hergestellt wurden.

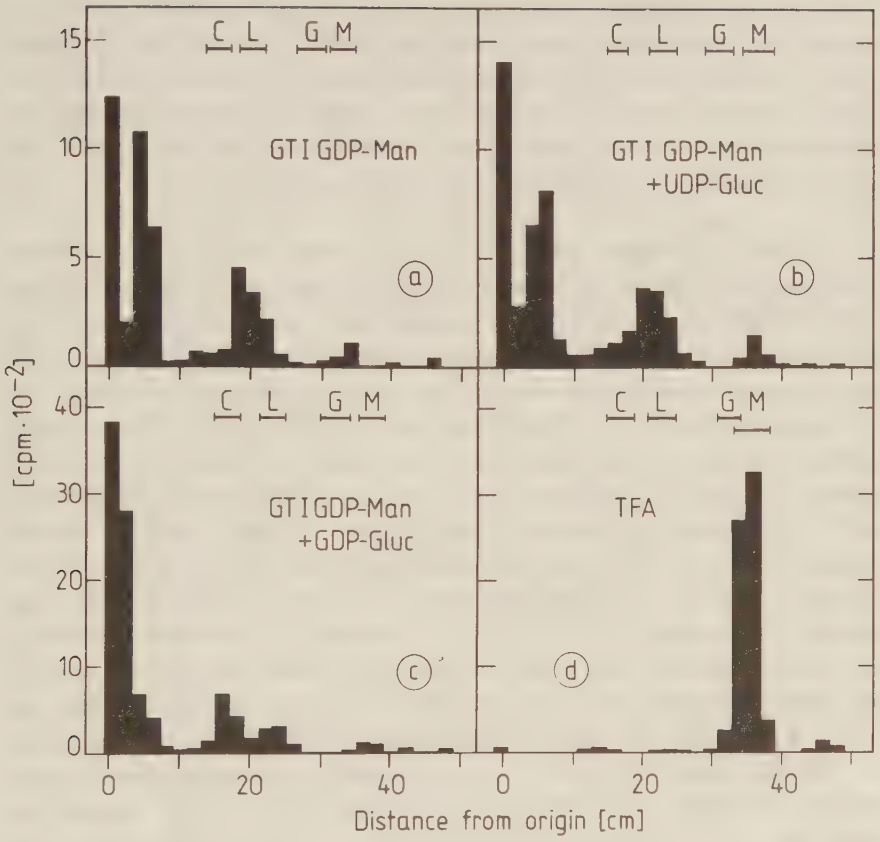


Abb. 45: Papierchromatographische Auftrennung von Ethanol-löslichen Hydrolysefragmenten der Produkte der GT GDP-$^{14}$C-Mannose. Die Produkte wurden mit ß-1,4-Endo-Glucanase behandelt (a - c) oder mit TFA (2,5 N; 4 h; 100 °C) hydrolysiert (d). Die Produkte wurden ohne Zweitsubstrat (a, d) bzw. in Anwesenheit unmarkiereter UDPG 1 µM (b) oder GDPG 1 µM (c) hergestellt.

Die papierchromatographische Trennung der Hydrolysebruchstücke ist in Abb. 44 dargestellt. Neben Glucose und Cellobiose trat bei den Produkten, die ohne GDP-Man hergestellt wurden, ein gewisser Anteil auf, der am Start liegenblieb. Die Enzymprodukte sind ß-1,4-Glucane. Cellobiose war das dominierende Hydrolysefragment in beiden Ansätzen (Abb. 44a,c). Wurden die Produkte in Anwesenheit von GDP-Man hergestellt, änderten sich die PC-Pro-

file. GDP-Man veränderte die Produkte von GT IU und GT IG (Abb. 44b,d). Im Bereich der Disaccharide tauchte neben Cellobiose ein weiterer Substanzfleck auf. Der größte Teil der Hydrolysefragmente blieb nun am Start liegen. Der Anteil von Cellobiose war stark reduziert. Zusätzlich war die Radioaktivität im Anfangsbereich des Chromatogramms breiter verteilt, was auf unterschiedlich große Oligoglycane schließen läßt.

Es wurde bereits erwähnt, daß unter den Bedingungen der GT I aus GDP-Mannose ebenfalls ein Ethanol-unlösliches Produkt gebildet wurde. Auch dieses Produkt wurde von der Endo-ß-1,4-Glucanase abgebaut. Das PC-Profil ist in Abb. 45a abgebildet. Vier Substanzflecken können unterschieden werden. Neben geringen Anteilen von Mannose ist ein Disaccharid vorhanden, das zwischen Cellobiose und Laminaribiose liegt. Die größten Anteile der Hydrolysebruchstücke blieben jedoch am Start und kurz danach liegen. Hierbei handelt es sich um Oligomere mit mehr als vier Zuckereinheiten. Das Produkt war vollständig hydrolysierbar in TFA, und als einziger Baustein tauchte Mannose auf. Es kann daher als Mannan bezeichnet werden. Wurden bei der Herstellung der Produkte GDPG bzw. UDPG mitinkubiert, veränderte sich auch diesmal das PC-Profil, vor allem im Fall von GDPG. Die zwei Substanzflecken am Anfang des Papierstreifens verschmolzen zu einem einzigen mit höchsten Werten am Startpunkt. Diese Tendenz zeichnete sich mit UDPG bereits ab. Der Anteil am Start wurde größer auf Kosten der Disaccharide und Oligoglycane. Das Mannan wurde bei UDPG- und vor allem GDPG-Anwesenheit im Test verändert. Die Profile von GT IG mit GDP-Man (Abb. 44d) und GT GDP-Man mit GDPG (Abb. 45c) sind fast identisch, obwohl im ersten Fall Glucose und im zweiten Fall Mannose radioaktiv markiert war. Es wird offensichtlich ein gemeinsames Produkt - ein Glucomannan - gebildet. Bei der enzymatischen Hydrolyse entstehen dann Glucose und Mannose, Cellobiose und Mannobiose sowie ein Disaccharid und Oligosaccharide aus Glucose und Mannose.

### 7.2.2. Gelfiltration der Produkte

Die Produkte der GT IU und GT IG sind teilweise KOH-löslich. Die löslichen Anteile können über ein Molekularsieb getrennt werden. Man erhält charakteristische Elutionsprofile. Produkte, die mit Membranen eines 14 K Sediments hergestellt wurden, wurden in KOH 4 % gelöst und auf Sephadex G-75 aufgetragen (Abb. 46).

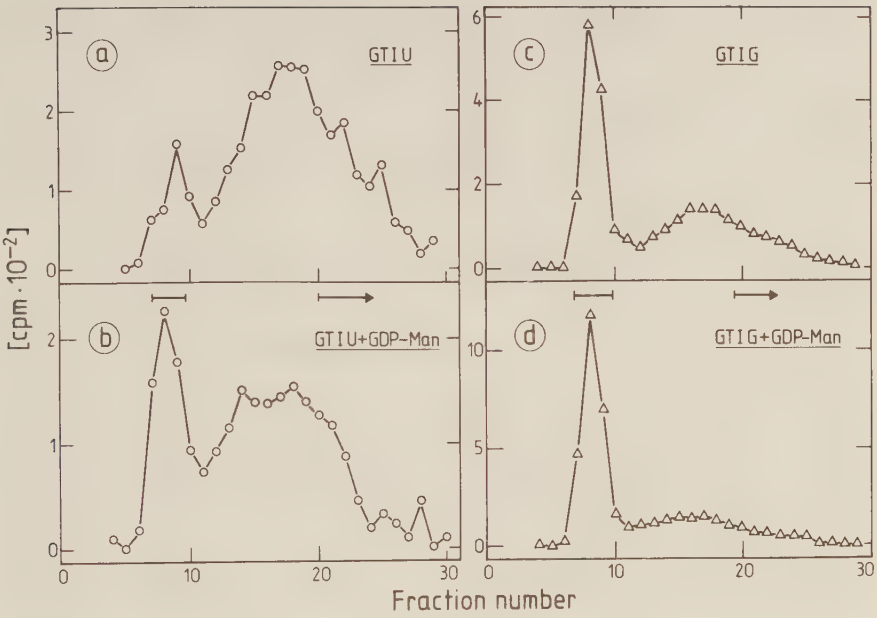


Abb. 46: Gelfiltration über Sephadex G-75. Elutionsprofile der 4 % KOH-löslichen Produktanteile (24 h, Zimmertemperatur) von GT IU und GT IG ohne GDP-Man (a und c) und mit GDP-Man (5 µM) im Testansatz (b und d). Die Produkte wurden mit NaOH (0,2 M) eluiert. Fraktion à 1 ml. Die Herstellung der Produkte erfolgte nach Tab. 3 mit 14 K Sediment bei 45 min Testzeit. Der Balken gibt die Elution von Dextran blue, der Pfeil die von K-Bichromat an.

Bei beiden Ansätzen ließen sich zwei Bereiche unterscheiden. Neben einem hochmolekularen Produktanteil, der bei GT IG viel ausgeprägter war, gab es eine breite Verteilung von markierten Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht, die beim GT IU-Produkt vorherrschten. Bei Produkten, die in Anwesenheit von GDP-Man hergestellt wurden, fand in beiden Fällen eine Verschiebung zu höheren Molekulargewichten statt. Der Anteil der meßbaren Radioaktivität in den Produktbestandteilen, die früh eluiert werden (d. h. groß sind), stieg unter Einfluß von GDP-Man bei GT IU von 12 % auf 24 % und bei GT IG von 43 % auf 56 %. Ein ähnliches Ergebnis erhielt man, wenn die Produkte in 24 % KOH gelöst wurden. Es traten dann allerdings mehr niedermolekulare Produktanteile auf. Die Verschiebung zu größeren Produkten war aber in gleicher Weise vorhanden.

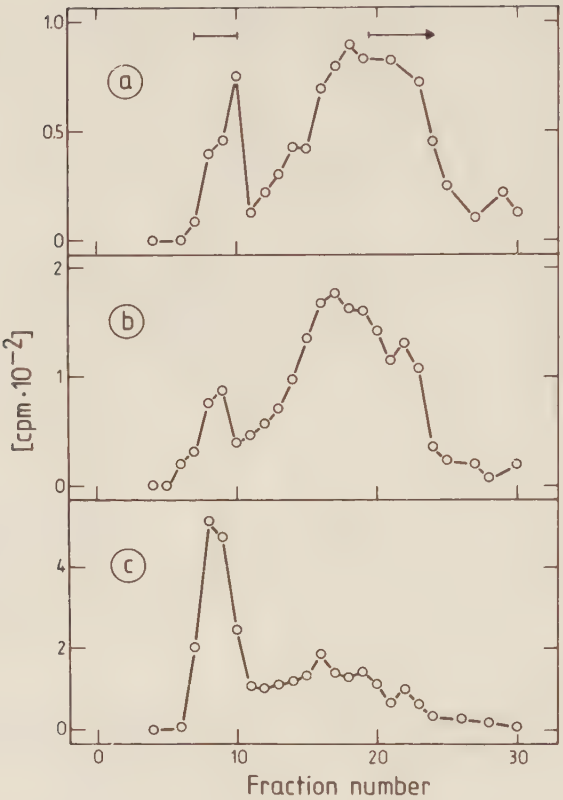


Abb. 47: Gelfiltration über Sephadex G-75. Elutionsprofile der 4 % KOH-löslichen Produktanteile (24 h, Zimmertemperatur) von GT GDP-$^{14}$C-Man. (a) Kontrolle, (b) mit UDPG (1 µM), (c) mit GDPG (1 µM). Eluiert wurde mit NaOH (0,2 M); Fraktion à 1 ml. Die Produkte wurden bei 25 °C mit 35 µg Protein (14 K Sediment), $MgSO_4$ (60 mM) und 60 min Inkubationszeit hergestellt. Der schwarze Balken gibt die Elution von Dextran blue, der Pfeil die von K-Bichromat an.

Der Gegenversuch ist in Abb. 47 dargestellt. Hier wurde wieder GDP-$^{14}$C-Mannose zur Markierung des Produktes verwendet. Das synthetisierte Mannan ist ebenfalls löslich in 4 % KOH (92 %). Das Elutionsprofil der Sephadex G-75-Säule zeigt in der Kontrolle einen Produktanteil, der mit Dextran blue eluiert wurde und eine breite Verteilung von Produkten gegen Ende der Elu-

tion. Bei Anwesenheit von UDPG bzw. GDPG bei der Produktbildung blieb die KOH-Löslichkeit erhalten (87 % bzw. 92 %). UDPG vermochte das Elutionsprofil nicht zu verändern. Mit GDPG dagegen stieg der Anteil des hochmolekularen Produktes von 14 % (Kontrolle) auf 46 %. Unter Einfluß von GDPG wurden mehr Produkte von hohem und weniger von niedrigem Molekulargewicht gebildet. Die Produkte aller drei Ansätze passierten eine Sephadex G-50-Säule ungehindert. (Ausschlußvolumen für Dextrane 10000)

## 8. In vivo-Einflüsse auf die Glucosyltransferasen

### 8.1. Gibberellinsäure $GA_3$

Die Glucosyltransferasen, isoliert aus Zellen, die ohne ($DC_b$ 1) und mit ($DC_w$) $GA_3$ kultiviert wurden, unterscheiden sich in der spezifischen Aktivität. Die GT IU war in den $GA_3$-Kulturen weniger aktiv, die GT IIU dagegen gesteigert (Tab. 7). Diese Zellen wurden permanent in $GA_3$-Medium kultiviert. Bei Zellen, die für kurze Zeit in $GA_3$-Medium überführt wurden, konnte man ebenfalls eine Änderung der spezifischen Aktivität der GT II feststellen. Die Zellen wurden am 10. Kulturtag geerntet und aufgearbeitet. Gegenüber der Kontrolle ohne $GA_3$ war die spezifische Aktivität bei $3.10^{-8}$ M um 51 % bei $3.10^{-7}$ M um 76 % erhöht.

In einem weiteren Versuch stieg die spezifische Aktivität der GT IIU bei $3.10^{-7}$ M $GA_3$ gegenüber der Kontrolle um 65 %. Die Zellen wurden am 7. Kulturtag geerntet. Die GT IU war unbeeinflußt. Höhere $GA_3$-Konzentrationen (bis $3.10^{-4}$ M) führten zu einer Verminderung der spezifischen Aktivitäten um 25 %.

### 8.2. Lanthanchlorid

$LaCl_3$ soll den $Ca^{2+}$-Spiegel in den Zellen beeinflussen können (siehe III.3.6.1.). $Ca^{2+}$ ist in vielen Fällen bei Regulationsvorgängen in Pflanzen beteiligt (SCHLEICHER et al., 1982; KÖHLE et al., 1985).

Zellen ($DC_b$ 1) wurden in I2a-Medium kultiviert. Am 6. Kulturtag wurde $LaCl_3$ steril zugegeben. Als Kontrolle diente $FeCl_3$. Nach 12 h wurden die Zellen geerntet und aufgearbeitet.

Tab. 26: Einfluß von $LaCl_3$ auf GT IU und GT IIU. Änderung der spezifischen Aktivität und des Proteingehalts in %, bezogen auf die Kontrolle.

| | GT IU | GT IIU | Protein |
|---|---|---|---|
| Kontrolle | 100 | 100 | 100 |
| $FeCl_3$ 0,1 mM | 93 | 93 | 106 |
| $LaCl_3$ 0,01 mM | 81 | 101 | 112 |
| $LaCl_3$ 0,1 mM | 71 | 124 | 102 |

In ähnlicher Weise wie beim Einfluß von $GA_3$ wird die GT IIU leicht gesteigert. Die spezifische Aktivität der GT IU wird reduziert.

8.3. NDA - ein Wachstumsregulator

Die Substanz und ihre Wirkung auf pflanzliche Systeme wurde bereits unter Punkt III.3.11.4. vorgestellt. Wird NDA ($10^{-4}$ M) am 3. Kulturtag zu in Suspension kultivierten Zellen zugegeben, so verfärbt sich die Kultur und wird rosa.

Tab. 27: Wirkung von NDA. Zugabe von NDA in Aceton, Endkonzentration im Kulturmedium, 0,1 mM. Die Zellen wurden am 7. Kulturtag, d. h. 4 Tage nach NDA-Applikation geerntet und aufgearbeitet.

| | Kontrolle Aceton | NDA 0,1 mM |
|---|---|---|
| Frischgewicht | 0,21 $g.ml^{-1}$ | 0,057 $g.ml^{-1}$ |
| Protein im Rohhomogenat | 1,95 $mg.ml^{-1}$ | 3,77 $mg.ml^{-1}$ |
| GT IU ($cpm.mg^{-1}$ Protein) | 6130 (100 %) | 1640 (26,7 %) |
| GT IIU ($cpm.mg^{-1}$ Protein) | 23280 (100 %) | 9590 (41,2 %) |

Der Proteingehalt von 7-Tage-alten Zellen, kultiviert mit NDA, ist gleich wie der von 3-Tage-alten, kultiviert ohne NDA. Die Kultur wächst nicht mehr weiter. Die spezfischen Aktivitäten der GT IU und GT IIU sinken. Auch die absoluten Werte sind trotz höherem Proteineinsatz niedriger als in der Kontrolle. Die Verteilung der beiden Enzyme bei differentieller Zentrifugation in Sediment- und Oberstand-Fraktionen war mit und ohne NDA gleich. Nach der Zentrifugation bei 164000g erscheint der Oberstand hell, das Sediment ist rosa gefärbt. NDA hemmt das Wachstum der Zellen (GROSSMANN et al., 1982, 1983). Bei Baumwollkulturen wirkt NDA hemmend auf das Wachstum, die Synthese von Cellulose und nichtcelluloseartigen Wandbestandteilen (SCHWER, 1984). Die Zellen bleiben aber vital und beginnen nach Überführung in NDA-freies Medium wieder zu wachsen.

Im in vitro-Test konnte NDA ($10^{-6}$ und $10^{-4}$ M) weder die GT IU noch die GT IIU hemmen bei Verwendung von Enzymfraktionen aus unbehandelten Zellen. Auch die GT IG und die GT IsU blieben unbeeinflußt. Die Hemmeffekte von NDA laufen bei Gossypium hirsutum parallel mit der Verfärbung der Zellen und kommen offenbar erst durch die Wechselwirkung der Substanz mit metabolisch aktiven Zellen zustande (SCHWER, 1984).

## IV. DISKUSSION

Zwei ß-Glucansynthetasen werden routinemäßig als Leitenzyme bei Membranreinigungen gemessen (QUAIL, 1979). Für Untersuchungen der in vitro-Synthese von Zellwandkomponenten (ß-1,3- und ß-1,4-Glucane) bilden diese Enzyme ebenfalls die Grundlage. Es sind die als Glucansynthetase I und II (RAY, 1979) bezeichneten enzymatischen Aktivitäten. Da die beiden Enzyme häufig aus gleichen Proteinfraktionen gemessen werden und das gleiche Substrat (UDPG) verwendet wird, beruht die Differenzierung zunächst auf den unterschiedlichen Testbedingungen. Die Grundlagen für die Durchführung der Tests gehen zurück auf Arbeiten von VAN DER WOUDE et al. (1974), RAYMOND et al. (1978) und RAY (1979). Bei hohen Substratkonzentrationen (mM) und wenig oder kein $MgCl_2$ bildet die in der Plasmamembran lokalisierte GS II vornehmlich ß-1,3-Glucane. In Golgi-Membranen sitzt die Glucansynthetase I, die vorwiegend ß-1,4-Glucane bildet und bei niederen Substratkonzentrationen (µM) in Anwesenheit von $MgCl_2$ optimal arbeitet. Vergleicht man jedoch die von verschiedenen Arbeitsgruppen verwendeten Testbedingungen, so findet man eine Reihe von Unterschieden, was die Zusammensetzung der Testansätze, den pH-Wert im Test sowie das verwendete Proteinmaterial betrifft. Auch beim Abstoppen der Testansätze und der Aufarbeitung der Produkte findet man große Unterschiede. Da eine ausführliche Charakterisierung der gemessenen Enzyme und deren Produkte oft unterbleibt, ist die Frage berechtigt, ob in den verschiedenen Fällen dieselben Enzyme gemessen wurden. Besonders im Fall der GS I ist die Unsicherheit groß, da ß-1,4-glucosidische Bindungen in verschiedenen Substanzen vorkommen, z. B. Xyloglucane, Glucomannane, Cellulose, Glycoproteine, Glycolipide. Die Tatsache, daß in den beiden Testansatzen nicht ausschließlich ß-1,4-Bindungen (GS I) bzw. ß-1,3-Bindungen (GS II) auftreten, ist ein Hinweis darauf, daß die Testbedingungen nicht selektiv sind für einzelne ß-Glucansynthetasen. Will man einen Zusammenhang herstellen zwischen Bestandteilen der pflanzlichen Zellwand, in vitro synthetisierter Bauelemente und den zugehörigen Enzymen, so ist eine genaue Charakterisierung beteiligter Enzyme von größter Wichtigkeit. Im Idealfall würde dies eine Solubilisierung der membranintegralen Enzyme mit anschließender Reinigung einschließen. Hinsichtlich der Lokalisierung der Enzyme, ihrem Transport zum Wirkort sowie der Regulation ihrer Aktivität und Synthese während der Zellwandbildung würden sich dadurch neue Möglichkeiten eröffnen.

1. Glucosyltransferasen in Zellkulturen

Die als GS I und GS II bekannten β-Glucansynthetasen wurden in Monokotyledonen, z. B. Zea mays (RAY, 1979; HENDRIKS, 1978), Lolium multiflorum (HENRY und STONE, 1982a), und Dikotyledonen z. B. Gossypium hirsutum (DELMER et al., 1977), Pisum sativum (RAY et al., 1969; MACLACHLAN et al., 1979), Nicotiana tabacum (HAASS et al., 1981) und Daucus carota (LANGE-BARTELS et al., 1981) nachgewiesen, obwohl die Zusammensetzung der Zellwände gewisse Unterschiede aufweist. Auch in verschiedenen Pilzen, z. B. Saprolegnia monoica (FÈVRE und ROUGIER, 1981), wurden diese Enzyme gefunden. Für die Isolierung der Synthetasen werden verschiedene Gewebe oder Pflanzenteile herangezogen, die sich in teilungs- oder streckungsfähigem Zustand befinden und zusätzlich eine gewisse Homogenität des Materials aufweisen. Gewebekulturen sind ebenfalls ein wichtiges System bei der Untersuchung der Zellwandsynthese der Pflanzen. Man muß aber anmerken, daß die Zellwand von in Suspension kultivierten Zellen Unterschiede zu solchen aus Pflanzenteilen aufweist wie BLASCHEK et al. (1982) bei Tabak zeigen konnten. Abweichungen gibt es sowohl im Anteil verschiedener Makromoleküle als auch im Polymerisierungsgrad von z. B. Cellulose. In zellwandregenerierenden Protoplasten sind die GS I und II ebenfalls nachweisbar. LANGE-BARTELS et al. (1981) berichteten, daß die spezifische Aktivität der GS I 20 h nach der Isolierung der Protoplasten stark anstieg.. Die GS II stieg schon gleich nach der Isolierung an, und der Anstieg war nach 20 h abgeschlossen.

Die Glucansynthetasen I und II sind in Karottenzellen, die in Suspension kultiviert werden, mit gut meßbaren Aktivitäten vertreten. Zusätzlich wurde in Zellextrakten eine weitere Enzymaktivität gefunden, die im Testansatz für GS I arbeitet, sich von der Glucansynthetase I aber in mehreren Punkten unterscheidet. Wird an Stelle von UDPG, GDPG als Substrat verwendet, so findet ebenfalls eine Glucansynthese statt. Der Einbau an Glucose ist sogar beträchtlich höher als mit UDPG.

Die vier enzymatischen Aktivitäten wurden zunächst als Glucosyltransferasen (GT) bezeichnet. Alle vier Enzymaktivitäten sind in unterschiedlichen Kulturlinien der Karotte nachweisbar. Allerdings treten Schwankungen in der spezifischen Aktivität auf, die teilweise auf das Gesamtalter der Kultur zurückzuführen sind. Bei langer Kultivierung werden offenbar schnellwachsende Zellen selektioniert. Das Wachstumsverhalten der Kultur ändert sich.

Da solche Kulturen eine gewisse Instabilität aufweisen und auf äußere Einflüsse reagieren können, ist eine routinemäßige Überprüfung der Kulturen hinsichtlich Wachstumsparameter und Enzymaktivitäten notwendig. Der Verlauf der Aktivität der vier Enzyme in Abhängigkeit vom Kulturalter gibt keinen Hinweis auf unterschiedliche Aktivitätsphasen der vier Glucosyltransferase-Aktivitäten. Lediglich die GT IsU ist bei frisch überimpften Zellen kaum nachweisbar und hat ihre höchste Aktivität in Zellen, die bereits die stationäre Phase erreicht haben. GT IU und GT IG halten in der Wachstumsphase ein gewisses Niveau und ihre Aktivität sinkt bei älteren Zellen ab. Bei GT IIU setzt der Aktivitätsrückgang etwas später ein. Da die Zellen der Kultur in ihrer Teilung nicht synchronisiert sind, sind die gemessenen Aktivitäten Durchschnittswerte von Zellen, die sich in einem unterschiedlichen physiologischen Zustand befinden. Ein interessanter methodischer Ansatz zur Untersuchung der Glucosyltransferase-Aktivitäten während des Teilungszyklus bildet das System, welches AMINO et al. (1984) vorstellten. Diese Autoren untersuchten die Aktivität der GS I und GS II in synchronisierten Kulturen von Catharanthus roseus. Die Aktivität der GS II steigt vor der Cytokinese an. Beide Enzyme sind mit der maximalen Synthese von Zellwand-Polysacchariden korreliert (KOMAMINE, 1985, persönliche Mitteilung). Im nicht synchronisierten System der Karotte kann, was die Glucosyltransferasen betrifft, nur eine Unterscheidung in Wachstumsphase und stationäre Phase der Kultur gemacht werden. Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase (4. - 5. Tag) sind für die Untersuchung aller vier Enzyme am besten geeignet. Die GT IsU scheint eine Besonderheit der Karottenkultur zu sein. Sie konnte in Petersilie- und Baumwollkulturen nicht nachgewiesen werden. In der Petersilie fehlte zudem die GT IG, wohingegen in der Baumwolle die GT IU nicht meßbar war (siehe IV.7.). Es muß hier aber die Einschränkung gemacht werden, daß die Zellaufarbeitung und die Testbedingungen für diese Systeme nicht optimiert waren. Nur von Präparaten aus Karottenzellen wird mit dem GT I-Ansatz sowohl UDPG als auch GDPG als Substrat verwendet. Glucoseeinbau im GT II-Ansatz mit UDPG findet man in allen Objekten, mit GDPG als Substrat konnte in keinem Fall ein Glucoseeinbau gemessen werden. Die Karottenzellen sind für Untersuchungen der Glucansynthetasen gut geeignet, wie der Vergleich der spezifischen Aktivitäten mit anderen Objekten zeigt, zumal alle vier Enzyme in befriedigendem Maße meßbar sind. Vor allem für die GS II liegen Daten vor. Für Baumwolle (DELMER et al., 1977), Erbsen (RAYMOND et al., 1978) und Kartoffeln (HEININGER, 1981) liegt der Glucoseeinbau durch die GS II bei 2 - 6 nMol.$min^{-1}$.$mg^{-1}$ Protein. In Hafer (LARSSON et al., 1984) und Zwiebeln (VAN DER WOUDE et al., 1974) sind die

Werte etwas höher und werden mit 12 bzw. 21 nMol.min$^{-1}$mg$^{-1}$ angegeben. HEININGER (1981) gibt für die GS I in Kartoffeln einen Einbau um 1 pMol.min$^{-1}$.mg$^{-1}$ an. Bei der Karotte lagen die Einbauraten bei Verwendung vergleichbarer Fraktionen bei 5 pMol durch die GT IU und 4 - 8 nMol durch GT IIU bezogen auf eine Minute und ein mg Protein.

2. Lokalisierung der Glucosyltransferasen

Die Synthese von ß-Glucanen aus Membranfraktionen ist ohne weiteres möglich, wie an vielen Objekten gezeigt wurde. Bereits 1958 berichteten FEINGOLD et al., daß in Membranfraktionen von Phaseolus aureus in Anwesenheit von UDPG ein ß-1,3-Glucan gebildet wird. Von der in vitro-Synthese eines ß-1,4-Glucans mit Extrakten aus höheren Pflanzen berichteten als erste BARBER et al. (1964) unter Verwendung von GDPG als Substrat. Inzwischen gibt es sehr viele Belege für die in vitro-Synthese von ß-1,3- und ß-1,4-Glucanen. In allen Fällen wurden Gesamtextrakte oder Membranfraktionen für die Messung der Enzyme verwendet. Es gibt keine Hinweise dafür, daß die ß-Glucansynthetasen lösliche Enzyme sind.

Alle vier hier untersuchten Enzymaktivitäten sind in Membransedimenten nachweisbar. Es überrascht, daß die Enzyme GT IU, GT IG und GT IIU bereits bei relativ niedrigen g-Zahlen sedimentieren. GT IIU ist bei 14000g bereits vollständig in der Sedimentfraktion. Aktivitäten der GT IG und GT IU findet man in geringen Anteilen auch noch in Sedimenten bei höheren Beschleunigungen. Gewöhnlich werden Fraktionen verwendet, die bei 100000g sedimentieren. Unter den Testbedingungen der GT IU arbeitet ein Enzym, das selbst bei 175000g noch im Überstand bleibt. Diese Aktivität wurde als GT IU "soluble" bezeichnet. Sie ist ebenfalls im Sediment zwischen 100000-175000g enthalten und unterscheidet sich grundlegend von der GT IU.

Zwei Membransysteme werden mit der Synthese von Zellwandbestandteilen in Zusammenhang gebracht. In ihnen sind in vitro meßbare Glycosyltransferasen lokalisiert. Die Lokalisation der beiden Glucansynthetasen I und II wurde von einer Reihe von Autoren bei den verschiedensten Objekten untersucht, z. B. RAY et al. (1969), MACLACHLAN et al. (1979) bei Erbsen, HENDRIKS (1978) und RAY (1979) bei Mais, VAN DER WOUDE et al. (1974) bei Zwiebeln, ROBINSON et al. (1982) bei Erbsen, Kürbis und Karotten sowie FÈVRE und ROUGIER (1981) bei dem Pilz Saprolegnia monoica. Die beiden Enzyme werden selbst als Leitenzyme für Membranen des Golgi-Apparates (GS I = GT IU) und der

Plasmamembran (GS II = GT IIU) bei Membrantrennungen zur Charakterisierung herangezogen (ROBINSON, 1985). Die strenge Verteilung der beiden Glucansynthetasen auf Golgi- und Plasmamembran ist aber nicht für alle Objekte gesichert. Es gibt in linearen Dichtegradienten immer wieder Überlappungen der Aktivitätsgipfel der gemessenen Enzyme, und für Saprolegnia monoica konnten GIRARD und FÈVRE (1984) sogar nachweisen, daß beide Enzyme in der Plasmamembran lokalisiert sind. Ob solche Überlappungen bei Pflanzen ebenfalls auf das Vorhandensein beider Enzyme in ein und derselben Membran zurückzuführen sind, ist nicht immer zweifelsfrei geklärt. In Suspensionskulturen von Zuckerrohr (ROBINSON und GLAS, 1983) und Lolium multiflorum (HENRY et al., 1983) fanden die Autoren beide Enzyme sowohl in Golgi- als auch Plasmamembran-Fraktionen. Unzulängliche Trennung von Membranen ähnlicher Dichte und die geringe Selektivität der Testbedingungen spielen hierbei ebenfalls eine Rolle.

Bei anderen Leitenzymen, die zur Identifizierung der Plasmamembran ($K^+$-ATPase) und von Golgi-Membranen (latente IDPase) herangezogen werden, stößt man auf ähnliche Schwierigkeiten (CROSS und BRIGGS, 1976; ROBINSON, 1985). Der Dichtebereich, in dem Plasmamembranen in linearen Saccharose-Gradienten akkumulieren, ist sehr breit. Er hängt von den verwendeten Objekten sowie den Trennbedingungen ab und liegt zwischen 1,13 bis 1,18 $g.cm^{-3}$. Zum Beispiel beeinflußt die An- bzw. Abwesenheit von $Mg^{2+}$ im Gradientenmedium die Lage der Plasmamembranfraktion erheblich (ROBINSON et al., 1982). In der Regel werden Dichten angegeben, die über 1,16 $g.cm^{-3}$ liegen, wenn $MgCl_2$ im Gradient anwesend ist. Die für die Plasmamembran der Karotte ermittelte Dichte liegt bei 1,17 $g.cm^{-3}$, was mit Daten früherer Arbeiten übereinstimmt (INGOLD, 1982). Im Bereich der Golgi-Membranen (Dichtebereich 1,12 - 1,15 $g.cm^{-3}$) findet man die GT I, gemessen mit GDP-Glucose (1,13 $g.cm^{-3}$). Auch die GT IU hat bei dieser Dichte ein Optimum. Ein Plateau der GT IIU, welches in diesem Dichtebereich liegt, ist je nach Versuchs- und Testbedingungen unterschiedlich stark ausgeprägt. Auf die GT IsU-Aktivität sowie das zweite Maximum der GT IU bei einer Dichte von 1,08 $g.cm^{-3}$ wird in Punkt IV.6. gesondert eingegangen. Das Konzept der Lokalisation der GS IU in Golgi- und der GS IIU in Plasmamembranen gilt auch für diese Suspensionskultur der Karotte, was durch die Profile der Leitenzyme latente IDPase und $K^+$-ATPase sowie der Membrandichten belegt wird. Viel wichtiger für die Charakterisierung der Enzyme ist aber die Tatsache, daß die GT I- und GT II-Aktivitäten sehr gut voneinander getrennt sind (siehe Abb. 7). Dies eröffnet die Möglichkeit, die Enzyme ohne störenden Einfluß durch

andere Aktivitäten zu untersuchen. Allein die GT IU und die GT IG sind in Membranen der selben Dichte lokalisiert. Der Frage, ob es sich dabei eventuell um ein und dasselbe Enzym handelt, wird in Punkt IV.7. diskutiert.

Ein wichtiger Gesichtspunkt ist die Frage, wie die Membranvesikel nach dem Zellaufschluß orientiert sind. Protoplasten können keine Nukleotid-Zucker für die Synthese von ß-Glucanen verwerten (DELMER, 1983). Es wird daher angenommen, daß das Substrat von der cytoplasmatischen Seite her angeliefert werden muß. In Zellhomogenaten findet aber eine Glucansynthese statt, auch von der GT IIU, die in der Plasmamembran lokalisiert ist. Es gibt daher entweder Vesikel, die "in-side-out" orientiert sind, oder die Vesikel sind für die Substrate durchlässig. Wäre ein Transportsystem für Nukleotid-Zucker in der Plasmamembran vorhanden, müßten auch Protoplasten diese Substrate verwerten können. Bei Endo-Membranen werden solche Transportsysteme diskutiert (HASELBECK und TANNER, 1982). LARSSON et al. (1984) berichteten über die Isolierung von reinen "right-side-out"-Vesikeln. Sie trennten die Membranen auf Grund ihrer Oberflächeneigenschaften in einem PEG/DEXTRAN Zweiphasensystem. Obwohl die cytoplasmatische Seite im Innern der Vesikel liegt, konnten die Autoren eine GS II-Aktivität messen.

Nach Behandlung der Membranfraktionen mit Trypsin ging der Einbau von Glucose bei allen Glucosyltransferasen zurück. Die Enzyme selbst, oder ihre Umgebung wurden so stark geschädigt, daß sie ihre Aktivität einbüßten. Durch nachfolgende Behandlung mit Filipin und besonders Digitonin konnte bei der GT IIU wieder ein geringer Einbau gemessen werden. Digitonin und Filipin binden an Sterole in Membranen (AXELOS und PEAUD-LENOEL, 1978; BEHNEKE et al., 1984). Sterole haben Einfluß auf die Fluidität und Permeabilität der Membranen. Die einfachste Erklärung für das Auftauchen neuer GT IIU-Aktivität lautet: Trypsin inaktiviert alle nach außen liegende GT IIU-Enzymeinheiten. Durch anschließende Behandlung der Membranen mit Digitonin wird Substrat jenen Enzymen zugänglich gemacht, die an der Innenseite der Vesikel lagen und dadurch vor Trypsin geschützt waren. Die GT IU und GT IG sind durch Digitonin dagegen nicht mehr aktivierbar. Ihre Integration in die Membranen oder die Orientierung der Membranvesikel ist somit anders.

### 3. Charakterisierung der Glucosyltransferasen im in vitro-Test

Ausgehend von den Glucansynthetase I- und II-Testansätzen nach RAY (1979) wurden vier verschiedene enzymatische Aktivitäten charakterisiert und ver-

glichen. Das System mußte insofern erweitert werden, da im Testansatz für GS I (Golgi-lokalisierte Glucansynthetase) auch eine lösliche enzymatische Aktivität meßbar war, die als GT Is (s = soluble) bezeichnet wurde. Auch mit GDPG als Substrat wurde Glucose in Ethanol-unlösliches Produkt unter den Bedingungen der GS I eingebaut. Diese Aktivität wurde als GT IG bezeichnet. Die GS I und GS II mit UDPG als Substrat wurden entsprechend in GT IU und GT IIU umbenannt. Die Bezeichnung Glucosyltransferase (GT) erschien zunächst sinnvoller, da die Identität der Enzyme nicht ausreichend geklärt war. Eine enzymatische Aktivität, die Mannose aus GDP-Man in Ethanol-unlösliches Produkt einbaute, wurde als Glycosyltransferase (GT GDP-Man) bezeichnet. Dieses Enzym wurde nur in Zusammenhang mit der Glucomannansynthese untersucht (siehe IV.8.). Die Charakterisierung der Enzyme hatte zum Ziel, die verschiedenen Glucosyltransferasen voneinander abzugrenzen. Mit den gewonnenen Kenntnissen sollten sich Testsysteme aufstellen lassen, die selektiv für die Messung einzelner Glucosyltransferasen sind, auch bei der Verwendung von Rohhomogenaten oder Gesamtmembranfraktionen.

Stabilität der Enzyme: Alle vier Glucosyltransferasen sind relativ stabil. Vor allem in gefrorenem Zustand tritt selbst bei Lagerung über mehrere Monate bei -70 °C nur ein geringer Aktivitätsverlust ein. Von Vorteil ist dabei, wenn die Fraktionen eine hohe Proteinkonzentration haben (6 - 10 mg/ml) und erst nach dem Auftauen auf die gewünschte Konzentration verdünnt werden. Ganze Zellen können ebenfalls über Monate gelagert werden. Die Stabilität der Enzyme erlaubt es, die Zellen in flüssigem Stickstoff aufzuschließen. Sogar nach Gefriertrocknung der Membranen und Resuspendierung in Puffer ist die spezifische Aktivität der Enzyme aus Karottenzellen kaum verändert. Die meisten Autoren verwenden frisches Pflanzenmaterial und möglichst schonende Zellaufschluß-Methoden, da sie eine Zerstörung und damit Inaktivierung von möglicherweise komplexen Proteinaggregaten vermeiden wollen. Die Tatsache, daß eine in vitro-Synthese von fibrillärem Cellulosematerial bisher nicht gelungen ist, wird teilweise auf solche Schädigungen zurückgeführt (ROBINSON und QUADER, 1981).

Temperatur und pH: Nur die lösliche GT IsU zeigt bis zu sehr hohen Temperaturen steigende Aktivität. Eine Aktivitätssteigerung bis 40/50 °C ist allerdings für lösliche Enzyme nicht ungewöhnlich (BISSWANGER, 1979) und wird erst durch zunehmende Denaturierung der Proteine unterbunden. Bei membranintegralen Enzymen spielt die Lipid-Zusammensetzung der Membran eine große Rolle. Die Glucansynthetasen werden meistens bei 25 °C gemessen

(RAY, 1979; ROBINSON und GLAS, 1983; HENRY und STONE, 1982a). Einige Autoren inkubieren aber auch bei 30 °C (MACLACHLAN et al., 1979; BLASCHEK et al., 1983). Zur Messung einer UDP-Glucose-Protein-Transglucosylase aus Kartoffeln wählten LAVINTMAN et al. (1974) 35 °C als Testtemperatur.

Die Aktivität der Enzyme wird durch die Protonenkonzentration beeinflußt. Fast immer beträgt der pH im Test 7,5. Bei diesem Wert zeigen die membranintegralen Glucosyltransferasen der Karotte ein Optimum. HENRY und STONE (1982a) wiesen bei Lolium multiflorum eine Abhängigkeit des Bindungstypes in den Ethanol-unlöslichen Produkten vom pH-Wert im Test nach. Die Enzymquelle war eine Gesamtmembranfraktion. Die Unterschiede in den Produkten könnte demnach auf unterschiedliche Enzyme zurückzuführen sein, die bei verschiedenen pH-Werten optimal arbeiten.

Ionen und Komplexbildner: Auf den Einfluß von Ionen auf die Enzymaktivität wurde in vielen Arbeiten hingewiesen. Vor allem zweiwertige Kationen spielen eine große Rolle. Die GS I ist nach RAY (1979) $Mg^{2+}$-abhängig, die GS II kommt ohne $Mg^{2+}$ aus (siehe Tab. 2).

Im verwendeten System stellte sich heraus, daß die GT IU und GT IG in Abwesenheit von Ionen nicht arbeiten. $MgSO_4$ war als Aktivator vorteilhafter als $MgCl_2$. Auch $Mn^{2+}$ förderte die Aktivität dieser beiden Enzyme. HENRY und STONE (1982a) fanden, daß eine Glucansynthetase gemessen mit µM-Substratkonzentrationen durch $Ca^{2+}$, $Mn^{2+}$ und $Zn^{2+}$ stimuliert wurde. $Mg^{2+}$ hatte keinen Effekt. Bei höheren Substratkonzentrationen trat auch mit $Mg^{2+}$ eine Förderung des Glucoseeinbaus ein. Die Autoren wiesen darauf hin, daß die $Mg^{2+}$-Abhängigkeit für jedes System neu überprüft werden sollte. Eine Sonderstellung nimmt wiederum GT IsU ein. Diese Aktivität wird durch $La^{3+}$ und vor allem $Zn^{2+}$ drastisch gesteigert.

Neben $Mg^{2+}$ wird die GT IIU vor allem durch $Ca^{2+}$ aktiviert. In vivo übt $Ca^{2+}$ einen stimulierenden Effekt auf die Cellulosesynthese in Baumwollfasern aus (CARPITA und DELMER, 1980). Auch bei der Mikrofibrillenbildung bei der Alge Oocystis wird $Ca^{2+}$ eine wichtige Rolle zugesprochen (QUADER und ROBINSON, 1979). Das Produkt der GT IIU ist jedoch eindeutig ein ß-1,3-Glucan. In diesem Zusammenhang sind Arbeiten von KAUSS et al. (1983) und KÖHLE et al. (1985) interessant. Diese Autoren sprechen $Ca^{2+}$ bei der Antwort der Zellen auf Infektionen eine regulatorische Funktion zu. Durch die Behandlung mit einen Elicitor (Chitosan) wird bei Glycine max $Ca^{2+}$ wahrscheinlich aus der Zellwand freigesetzt. Die GS II-Aktivität in Homogenaten wird durch $Ca^{2+}$ reversibel stimuliert, wobei eine Mitwirkung von Calmodulin ausgeschlossen wird. Außerdem (20 min nach Chitosanbehand-

lung) setzt eine Akkumulation von ß-1,3-gebundener Glucose in der Zellwand ein. Ähnliche Mechanismen sind auch bei der Callosebildung nach Verletzungen denkbar.

$LaCl_3$ hat in vitro keinen Einfluß auf die GT IIU. Es wurden allerdings bei Funaria in vivo-Effekte von $La^{3+}$ auf $Ca^{2+}$ abhängige Prozesse beobachtet (SAUNDERS und HEPLER, 1983). In Lolium multiflorum fanden POLYA et al. (1984) eine Proteinkinase, die eine Reihe von Polypeptiden in Plasma- und endogenen Membranen phosphoryliert. Die Phosphorylierung wird durch Calmodulin-Antagonisten stimuliert und durch $La^{3+}$ gehemmt.

Die Ansprüche der vier Enzyme hinsichtlich bestimmter Ionen unterscheiden sich so stark, daß sie ausgenützt werden können, um die Selektivität des Testansatzes zu erhöhen. So wird z. B. die GT IIU bei hohen $MgSO_4$-Konzentrationen ( > 10 mM), wo die GT IU und GT IG optimal arbeiten, gehemmt. Bei der optimalen $CaCl_2$-Konzentration der GT IIU sind GT IU und GT IG dagegen inaktiv. Ähnlich verhält es sich mit $ZnCl_2$, das die GT IsU selektiv aktiviert. Die Kombination verschiedener Ionen im Test, wie von manchen Autoren durchgeführt (CALLAGHAN und BENZIMAN, 1984), ist in diesem System nicht von Vorteil.

Alle vier Enzyme sind abhängig von zweiwertigen Ionen. Dies gilt auch für die GT IIU und die GT IsU, obwohl diese Enzyme ohne exogenen Zusatz von Ionen im Test arbeiten. Durch Behandlung der Enzymlösungen mit EDTA oder EGTA werden sie inaktiviert. Auf die mögliche regulatorische Funktion von $Ca^{2+}$ wurde bereits hingewiesen. Die Chitosan-induzierte Callosesynthese wird in dem System sofort gestoppt, wenn das externe $Ca^{2+}$ durch EGTA weggefangen wird (KÖHLE et al., 1985). MONTEZINOS und DELMER (1980) wiesen darauf hin, daß EDTA den Einbau von Glucose in Cellulose bei Baumwollfasern unterbindet. Bei der Alge Oocystis apiculata bewirkt EDTA den Zerfall von plasmamembranlokalisierten Komplexen, die mit der Cellulosesynthese in Verbindung gebracht werden (MONTEZINOS und BROWN, 1979). Eine membrangebundene Glucansynthetase der Hefe wird dagegen durch EDTA aktiviert. Diese Aktivierung kann durch $MgCl_2$ wieder aufgehoben werden (SHEMATEK et al., 1980a,b).

Cellobiose: ß-glucosidisch verknüpfte Disaccharide wie Cellobiose und Laminaribiose stimulieren bei Baumwollfasern den Einbau von Glucose aus UDPG in ein ß-1,3-Glucan (DELMER, 1977). Vor allem bei niedrigen Substratkonzentrationen (µM) hängt die Aktivität von solchen Disacchariden ab. Bei der Karotte findet man eine Steigerung der Enzymaktivität nur bei GT IIU, die bei 0,5 mM UDPG gemessen wird. Das Produkt ist aber ebenfalls ein

ß-1,3-Glucan. HENRY und STONE (1982a) wiesen bei Lolium multiflorum nach, daß $^{14}C$-markierte Cellobiose nicht in in vitro-gebildeten Produkten enthalten ist, obwohl beide Glucansynthetasen (µM und mM) durch Cellobiose gesteigert werden. Die Glucosylreste werden demzufolge nicht an den möglichen "Primer" Cellobiose angehängt.

Substratkonzentration: Es hat sich durchgesetzt, die beiden Glucansynthetasen bei Substratkonzentrationen um 1 µM bzw. 0,5 - 1 mM zu messen. $K_m$-Werte werden in der Literatur allerdings selten angegeben. Da die Enzyme meist aus nicht oder nur teilgereinigten Fraktionen gemessen werden und die Bedingungen oft unterschiedlich sind, hat der Vergleich der apparenten $K_m$ nur bedingte Aussagekraft.

Die in der Literatur genannten app. $K_m$-Werte für GS I (≙ GT IU) und GS II (≙ GT IIU) lassen sich mit den vorliegenden Daten durchaus in Einklang bringen. DELMER et al. (1977) geben für eine Glucansynthetase in Baumwollfasern einen app. $K_m$-Wert von 5 mM an. Dieses Enzym wird durch Cellobiose aktiviert (app. $K_m$ 1,7 mM). Für die GS II aus Baumwoll-Suspensionskulturen ermittelte SCHWER (1984) einen Wert von 0,74 mM. CALLAGHAN und BENZIMAN (1984) gaben für ein Enzym aus Phaseolus aureus, das in Anwesenheit von $MgCl_2$ (6 mM) und $CaCl_2$ (4 mM) gemessen wurde, eine app. $K_m$ von 0,1 mM an. In diesem System wurde die app. Vmax durch Cellobiose im Testansatz verändert. Für eine ß-1,3-Glucansynthetase aus Candida albicans fand ORLEAN (1982) eine app. $K_m$ von 1,5 - 1,9 mM und FÈVRE (1983) bei Saprolegnia monoica einen Wert von 3,3 mM, wenn kein $Mg^{2+}$ im Testansatz enthalten ist. Mit $MgCl_2$ sank die app. $K_m$ auf 1,1 mM.

Die app. $K_m$ der GT IIU aus der Karotte liegt je nach Testbedingungen zwischen 0,37 - 2,3 mM. Cellobiose und $Ca^{2+}$ erniedrigen die app. $K_m$. Bei der UDPG-abhängigen GS aus Baumwollfasern beschrieb DELMER (1977) eine Aktivierung durch das Substrat - wie es in ähnlicher Weise auch bei der GT IU in diesem System vorkommt. Da die GT IIU in Anwesenheit von $MgSO_4$ (60 mM) nicht vollständig gehemmt ist, könnte bei höheren Substratkonzentrationen dieses Enzym aktiv werden und eine Substrataktivierung der GT IU vortäuschen. Von Substrataktivierungen UDPG-abhängiger Glucansynthetasen berichteten auch FÈVRE (1983) und HEININGER (1983).

Es gilt allerdings zu berücksichtigen, daß die Reaktionsmechanismen des Glucosyltransfers auf Akzeptor-Substanzen nicht bekannt sind. Da es sich um Mehrsubstratreaktionen handelt (Glucosyldonor und Akzeptor), wobei der Akzeptor sich zudem ständig verändert, sind kinetischen Daten ($K_m$, Vmax), die mit Hilfe der Michaelis-Menten-Theorie gewonnen wurden, zunächst

nur als Anhaltspunkte zu werten. Die Vielzahl der möglichen Mechanismen - als theoretische Möglichkeiten seien "Random Bi-Bi", "Ordered Bi-Bi" und "Ping-Pong Bi-Bi" bei Zweisubstratreaktionen genannt (DIXON und WEBB, 1979) - und die relativ komplizierten Geschwindigkeitsgleichungen erschweren die Analyse solcher Enzymreaktionen beträchtlich.

Für alle vier Enzyme gilt, daß die Messung nicht bei Substratsättigung durchgeführt wurde. Dies liegt daran, daß man mit radioaktiv markiertem Substrat möglichst sparsam umgehen will. Andererseits möchte man hohe cpm-Werte erhalten, um den Zuckereinbau gut messen zu können. Dies wäre bei zu starker Isotopenverdünnung durch nicht markiertes Substrat nicht mehr gewährleistet. Die Enzyme wurden deshalb bei sehr kurzen Zeiten und wenig Proteineinsatz gemessen.

Nukleotide: Für verschiedene Objekte wurde eine Beteiligung von GTP bei der Regulation der Glucansynthetase-Aktivität gefunden. In Acetobacter xylinum wird die ß-1,4-Glucansynthetase durch GTP aktiviert, wenn die Aufarbeitung in Anwesenheit von PEG durchgeführt wurde oder ein löslicher, nicht dialysierbarer, Hitze- und Trypsin-labiler Oberstandsfaktor zugesetzt wurde (ALONI et al., 1982). Nach der Vorstellung der Autoren bildet das Enzym zusammen mit diesem Faktor einen GTP-stimulierbaren Komplex mit hoher Aktivität (ca. 40 % der in vivo-Cellulosesynthese). ORLEAN (1982) berichtete, daß eine ß-1,3-Glucansynthase aus dem Pilz Candida albicans durch ATP und GTP gesteigert wird. Bei Saprolegnia monoica wird die GS I durch ATP (0,05 mM) und GTP (0,1 mM) ebenfalls stimuliert, bei höheren Konzentrationen aber ebenso wie die GS II gehemmt (FÈVRE, 1983). Bei der Regulation einer ß-1,3-Glucansynthetase bei Hefen sollen nach SHEMATEK et al. (1980a,b) ebenfalls GTP- und ATP-fördernden Einfluß ausüben, $Mg^{2+}$ dagegen hemmend wirken. Die Autoren fanden einen Verlust der GS-Aktivität in Anwesenheit von $Mg^{2+}$, der durch ATP und GTP wieder aufgehoben werden kann. Ähnliche Wirkungen von GTP und ATP wurden in höheren Pflanzen meiner Kenntnis nach nicht gefunden.

Auch in diesem System konnten keine signifikanten Steigerungen der vier Enzyme gefunden werden, wohl aber Hemmeffekte. Solche Hemmeffekte sind aus anderen Pflanzensystemen bekannt (HENRY und STONE, 1982a). In Pflanzen werden Nukleotide, die beim Transfer von Zuckern aus Nukleotid-Zucker anfallen, wahrscheinlich durch Nukleotidasen (IDPase, UTPase) aus dem Reaktionsgeschehen entfernt. Eine Anhäufung dieser Metabolite und damit verbundene Hemmeffekte werden so vermieden.

Nukleotid-Zucker: Nukleotid-Zucker sind die Substrate bei der Synthese von Zellwand-Polysacchariden. Glucose kann z. B. aus UDPG und GDPG in ß-Glucane eingebaut werden. Werden verschiedene Zucker-Nukleotide im Test angeboten, so ist eine gegenseitige Beeinflussung, in bezug auf den Einbau in ein Polysaccharid möglich. Dabei ist zu bedenken, daß die Wirkung vom Nukleotid und/oder vom Zuckeranteil ausgehen kann. Interessant ist die Abhängigkeit oder die Stimulierung des Einbaus eines Zuckers durch ein zweites Substrat, was möglicherweise auf die Bildung eines zusammengesetzten Produktes hinweist. So wird bei der Sojabohne Xylose aus UDP-Xylose nur in Anwesenheit von UDP-Glucose in ein Glycan eingebaut, das als Xyloglucan identifiziert wurde (HAYASHI und MATSUDA, 1981). Eine ähnliche Stimulierung einer UDP-Xylose-Polysaccharid Xylosyl-Transferase durch UDP-Glucose beschrieb RAY (1980) bei Erbsen. Eine Beeinflussung des Glucoseeinbaus aus GDPG durch GDP-Mannose wurde mehrfach beschrieben (ELBEIN und HASSID, 1966; ELBEIN, 1969; BRETT, 1981).

Die vier Glucosyltransferasen aus den Karottenzellen werden durch verschiedene Nukleotidzucker unterschiedlich beeinflußt. Nur bei der GT IG wurden stimulierende Effekte gefunden. GDP-Man war das wirksame Zweitsubstrat (siehe IV.8.). Mit anderen Zucker-Nukleotiden wurden Hemmeffekte festgestellt. Die Wirkung von UDP-Xyl, UDP-GlucNac und UDP-Gluc auf diese enzymatische Aktivität deutet an, daß der Zuckeranteil die wesentliche Rolle bei der Hemmwirkung spielt. Ob es sich bei den Hemmeffekten um eine einfache Kompetition handelt oder andere Mechanismen ebenfalls eine Rolle spielen, muß an dieser Stelle offen bleiben.

Inhibitoren: Inhibitoren, sofern sie eine gewisse Spezifität besitzen, können sehr wirksame Instrumente bei der Aufklärung von Reaktionswegen oder Teilprozessen sein. Bei Fragen der Zellwandsynthese wird meistens ihre Wirkung in in vivo-Systemen auf die Synthese von Wandmaterial untersucht. Es wurden auch strukturelle Änderungen der Plasmamembran und der Endomembranen unter Einfluß von Effektoren mit Hilfe der Elektronenmikroskopie beobachtet (z. B. bei Filipin; ORCI et al., 1981). Die verwendeten Substanzen unterscheiden sich in Struktur und Wirkungsweise beträchtlich, wobei sehr oft der genaue Wirkungsmechanismus unbekannt ist. Neben Substanzen, die Ionen binden können (EDTA, EGTA) oder auf die Lipidumgebung von Membran-Proteinen wirken (Detergentien, Filipin) kommen Substratanaloge (Deoxyglucose), Färbesubstanzen (z. B. Calcofluor white, Anilin blau) sowie gewisse Antibiotica (Papulacandin B, TH-Echinocandin B) zum Einsatz.

Mit Ausnahme der Arbeit von CALLAGHAN und BENZIMAN (1984) gibt es

keine Berichte über eine in vitro-Hemmung der ß-1,4-Glucansynthese durch 2,6 DCB und Coumarin. Inzwischen veröffentlichten die Autoren allerdings einen Widerruf dieser Arbeit (CALLAGHAN und BENZIMAN, 1985). Da es bisher nicht gelungen ist, in vitro Cellulose zu synthetisieren, kann man folgerichtig auch keine Hemmung durch diese Cellulosesynthese-Hemmstoffe messen, zumal bei 2,6 DCB ein sehr direkter Wirkungsmechanismus in der Nähe des Enzyms angenommen wird (GALBRAITH und SHIELDS, 1982).

Effekte der Hemmstoffe der ß-1,3-Glucansynthese bei bestimmten Pilzen wurden bisher vornehmlich in in vivo-Systemen beobachtet (BAGULEY et al., 1979; CASSONE et al., 1981; PÉREZ et al., 1983). Über eine Aktivierung der in vitro gemessenen ß-1,3-Glucansynthetase durch TH-Echinocandin, wie sie hier bei der Karotte gefunden wurde, gibt es bislang keine Berichte. Obwohl die Effekte in der Karotte und in Pilzen entgegengesetzt sind, haben die Synthesesysteme möglicherweise einige Gemeinsamkeiten, da in beiden Fällen die ß-1,3-Glucansynthese stark beeinflußt wird.

Von Calcofluor white wurde berichtet, daß es durch Bindung an die Glucanketten die Kristallisierung zu fibrilärer Cellulose von der Synthese entkoppelt (bei Acetobacter xylinum BENZIMAN et al., 1980, HAIGLER et al., 1980; bei Oocystis apiculata QUADER, 1981, ROBERTS, et al., 1982). In vivo läuft die Synthese der ß-1,4-Glucane ungehindert weiter, es findet aber keine Fibrillenbildung mehr statt. Auch die Fibrillenbildung bei der Chitinsynthese bei Poterioochromonas wird durch Calcofluor white unterbunden (HERTH, 1980). Da alle vier Enzyme stark gehemmt wurden, kann von einer Spezifität nicht gesprochen werden. Möglicherweise resultiert die Hemmung nicht auf Grund der Bindung an die neu gebildeten Oligoglucane, sondern durch unspezifische Effekte auf die Substrate, die Proteine und/oder Membranen.

Die Wirkung von EDTA und EGTA sind in Zusammenhang mit Einflüssen von zweiwertigen Kationen zu sehen. Da alle ß-Glucansynthetasen von solchen Ionen beeinflußt werden, sind diese Komplexbildner ebenfalls relativ unspezifische Hilfsmittel bei der Untersuchung verschiedener ß-Glucansynthetasen. Es ist dennoch ratsam, Einflüsse der Ionen und der Komplexbildner in neuen Systemen zu untersuchen, zumal neben Fällen, in denen durch EDTA eine Hemmung auftritt, auch von Objekten berichtet wurde, wo EDTA zu einer Aktivierung der Enzyme führte (SHEMATEK et al., 1980a,b).

Der Wachstumsmodulator NDA (= Tetcyclacis) eignet sich hervorragend dazu, das Streckungs- und Teilungswachstum zu unterbinden (GROSSMANN et al., 1982, 1983; SCHWER, 1984). SCHWER (1984) konnte bei Gossypium hirsutum zeigen, daß unter Einfluß von NDA sowohl der in vivo-Einbau von

Glucose in Cellulose und nicht Cellulose-Material der Zellwand als auch die GS II-Aktivität reduziert wird.

In der Karotte sind die spezifischen Aktivitäten der GS I und GS II nach Vorinkubation der Zellen in NDA gegenüber Kontrollen reduziert. Wird NDA erst im in vitro-Testansatz zugesetzt, so bleiben die Enzyme unbeeinflußt. Das Wachstum der Zellen und die damit verbundene Zellwandsynthese werden durch NDA zwar gehemmt, die Änderungen der Glucansynthetase-Aktivitäten scheinen aber Sekundäreffekte zu sein. Eine direkte Wirkung von NDA auf Syntheseprozesse der Zellwand ist ziemlich unwahrscheinlich. Es gibt bislang keine weiteren Arbeiten, in denen Wirkungen von NDA im Hinblick auf die Zellwandsynthese untersucht wurden. Da die Hemmung der Zellteilung reversibel ist, könnte man diesen Wirkstoff eventuell zur Synchronisation von Suspensionskulturen verwenden.

## 4. Charakterisierung der Produkte

Bei der Charakterisierung der in vitro gebildeten Produkte sollte man folgende Aspekte berücksichtigen: Welche Zuckermonomere sind in dem Produkt enthalten? Auf welche Weise sind diese Zucker miteinander verknüpft? Wie groß sind die synthetisierten Polysaccharide? Der Polymerisierungsgrad ist besonders bei ß-1,4-Glucanen ein wichtiges Kriterium, wenn man klären will, ob ihre Bildung mit der in vivo-Synthese von Cellulose in Beziehung steht.

Da im Test nur radioaktiv markierte Glucose angeboten wurde (in einigen Fällen auch GDP-$^{14}$C-Mannose), kann man in der Regel davon ausgehen, daß die Produkte aus diesen Monomeren aufgebaut sind. Eine Epimerisierung der Zucker ist aber nicht von vorneherein auszuschließen. Verschiedene Methoden für die Charakterisierung stehen zur Verfügung. Sie eignen sich ebenso zur Untersuchung von Wandbestandteilen. Das unterschiedliche Löslichkeitsverhalten in Wasser (niedermolekulare Glycane), EDTA-Puffer (Pektine), kalter und heißer Alkali-Lösung (Hemicellulosen) wird oft für die Isolierung ausgenützt. Cellulose bleibt als unlöslicher Rest zurück. Dieses Verfahren bietet allerdings nur Anhaltspunkte und kann nicht als alleiniges Kriterium bei der Produktanalyse gelten. Es gibt z. B. neben Alkali- und wasserlöslichen ß-1,3-Glucanen (TAKEUCHI und KOMAMINE, 1981) auch Alkaliunlösliche (DELMER, 1977). Eine Identifizierung der glycosidischen Bindung und der Strukturmonomere ist daher unerläßlich. Neben Degradationsanalysen mit spezifischen Glycanasen (REESE, 1977) ist die Methylierungsanalyse eine wichtige Methode (Methodenübersicht bei BRETT, 1982).

Die Identifizierung der Hydrolyseprodukte oder Derivate der Methylierung kann mit Hilfe der Papierchromatographie bzw. der Gaschromatographie vorgenommen werden. Die letzte Methode kann auch, wie bereits in Punkt II.4.3.2. ausgeführt, zur Bestimmung des DP bei kurzen Oligosacchariden verwendet werden. Bei längeren Ketten ist eine Molekulargewichtsabschätzung, sofern die Löslichkeit der Substanz keine Probleme bereitet, über Gelfiltration möglich. Diese Methode wurde zur Größenbestimmung von Pektinen (ASAMIZU et al., 1983) und Hemicellulosen (NISHITANI und MASUDA, 1982) angewendet. Bei Alkali-unlöslichen ß-1,4-Glucanen kann man durch Nitrierung zu löslicher Nitrocellulose gelangen und über Viskositätsmessung die Größe bestimmen (ALEXANDER und MITCHELL, 1949; MARX-FIGINI, 1962; BLASCHEK et al., 1982).

Die in vitro synthetisierten Produkte der Enzyme aus Karottenzellen waren bis auf geringe Reste löslich in Alkali (24 %) und zum größten Teil hydrolysierbar durch TFA. Nur beim Produkt der GT IG war die Hydrolyse unvollständig. Von Cellulose kann demnach in keinem Fall gesprochen werden. Die Kombination aus enzymatischer Hydrolyse und Papierchromatographie ergab, daß die Produkte der GT IU und GT IG aus ß-1,4-glucosidisch verknüpften Glucoseeinheiten aufgebaut sind. Beim Produkt der GT IIU sind die Glucoseeinheiten ß-1,3-glucosidisch verbunden. Nur diese Bindungstypen konnten mit dieser Methode in den GT IU und GT IG bzw. GT IIU-Produkten nachgewiesen werden. Dies kann aber auch an der Empfindlichkeit der Methode liegen. Die Ergebnisse wurden durch die Methylierungsanalysen bestätigt. Hier traten auch in geringem Maße andere Bindungen zum Vorschein. Diese Analysen wurden allerdings mit Produkten durchgeführt, die unter den nicht optimierten Bedingungen hergestellt wurden (siehe Tab. 2 und Abb. 25).

Die Größe der Produkte wurde nur abgeschätzt und nicht genau ermittelt. Sie ist unterschiedlich bei den Produkten der GT IU und GT IG. Die gebildeten Glucanketten sind in ihrer Größe aber sehr heterogen. Die Elutionsprofile dieser beiden Produkte werden in Anwesenheit von GDP-Mannose verändert, was auf eine Modifikation des Produktes hinweist. Größere und homogenere Produkte werden von der GT IIU und GT IsU gebildet. In der Literatur gibt es selten Angaben über den DP von in vitro-gebildeten Glucanen. BLASCHEK et al. (1983) geben für ein Alkali-lösliches in vitro gebildetes Produkt bei Nicotiana tabacum einen DP von 40 an. Das Produkt besteht zu 90 % aus ß-1,3- und zu 10 % aus ß-1,4-Bindungen. Die Alkali-unlösliche Fraktion scheint nach Angabe der Autoren durch das Anfügen von ca. 40 Glucoseeinhei-

ten an ein membrangebundenes "Primer-Glucan" (DP 150 - 200) gebildet zu werden. Im Primer-Glucan gibt es nur ß-1,4-Bindungen. Bei dem in vitro angehängten Glucananteil wurden 88 % ß-1,4- und 12 % ß-1,3-Bindungen gefunden.

Angaben über den Bindungstyp in den in vitro gebildeten Produkten sind in der Literatur in der Regel aufgeführt. In allen dokumentierten Fällen findet man hauptsächlich eine ß-1,4-Glucansynthese bei mikromolaren Konzentrationen an UDPG und GDPG. Bei millimolarer Substratkonzentration werden vor allem ß-1,3-glucosidische Bindungen geknüpft, wenn Gesamtmembranfraktionen als Enzymquelle verwendet werden. Der Einfluß unterschiedlicher Testbedingungen auf die Art der Bindung kann leicht damit erklärt werden, daß verschiedene ß-Glucansynthetasen vorhanden sind, die mehr oder weniger gut im jeweiligen Testansatz arbeiten (HENRY und STONE, 1982a). Eine andere Erklärungsmöglichkeit bietet eine Hypothese von DELMER, die auf dem Zellwand-Kongreß in Fribourg (Schweiz, März 1984) dargelegt wurde. Demnach sollte derselbe Enzymkomplex bei der Synthese von ß-1,3- und ß-1,4-Glucanen beteiligt sein. Eine Regulation könnte über $Ca^{2+}$ und das Substratangebot erfolgen.

5. Solubilisierung der Glucosyltransferasen

Digitonin ist das Detergens, welches bei der Solubilisierung von membrangebundenen ß-Glucan-Synthetasen am häufigsten verwendet wurde. Dabei wurden u. a. Membranpräparationen von Phaseolus aureus (LIU und HASSID, 1971; BARBER, 1982), Lupinus albus (STAFFORD und BRUMMOND, 1970), Solanum tuberosum (HEININGER, 1983), Avena sativa (TSAI und HASSID, 1970) und Lolium multiflorum (HENRY und STONE, 1982b) verwendet. Auch bei dem Bakterium Acetobacter xylinum (ALONI et al., 1983) und dem Pilz Saprolegnia monoica (FÈVRE, 1979) wurde Digitonin erfolgreich eingesetzt. Bei Pisum sativum dagegen gelang eine Solubilisierung mit Digitonin nicht (RAY et al., 1969; MACLACHLAN et al., 1979). Mit Triton X-100 bei Phaseolus aureus (HELLER und VILLEMEZ, 1972) und Octylglucosid bei Lolium multiflorum (HENRY und STONE, 1982b) war es ebenfalls möglich, aktive Glucansynthetasen zu solubilisieren. Solubilisiert wurden in den verschiedenen Objekten sowohl ß-1,3- und ß-1,4-Glucansynthetasen als auch ß-1,3:ß-1,4-Glucansynthetasen (HENRY und STONE, 1982b; EIBERBERGER et al., 1985).

Bei der Karotte gelang es, ebenfalls Glucosyltransferasen in aktiver Form

zu solubilisieren. Dabei wurde unter den Bedingungen für die GT I ein Zuckereinbau mit UDPG, GDPG und GDP-Man erzielt. Das Kriterium für eine erfolgreiche Solubilisierung war der Transfer der Enzymaktivität aus einem Membransediment (30000g) in den 126000g Überstand. In ähnlicher Weise wurde in den oben erwähnten Arbeiten verfahren. Ein zweites Kriterium für eine erfolgreiche Solubilisierung ist die Elution der Präparation über eine Sepharose 6B-Säule. Wird das Protein im Ausschlußvolumen eluiert, handelt es sich um nicht solubilisierte Präparationen (COLOWICK und KAPLAN, 1984). In diesem Falle liegen Lipid-Protein-Detergens-Komplexe vor von großem Molekulargewicht. Dieses Kriterium wurde in der Literatur selten hinzugezogen. Einige Autoren führten nach der Solubilisierung eine Ammoniumsulfat-Fällung durch (LARSEN und BRUMMOND, 1974; LIU und HASSID, 1970), bei der solche Komplexe allerdings auch ausfallen können. Die Größe der solubilisierten GT IIU-, GT IU- und GT IG-Komplexe aus der Karotte konnte nicht bestimmt werden, da die Enzyme nach Trennung über AcA 34 (12 h)) inaktiv waren. Die GT IG ließ sich aber in aktiver Form über Sephadex G-75 trennen und wurde im Ausschlußvolumen eluiert. Dies entspricht einem Molekulargewicht von $\geq$ 70000. Die GT IsU war auch nach der Trennung über AcA 34 aktiv. Sie besitzt ein Molekulargewicht um 300000. Für die Isolierung dieses Enzyms wurde aber kein Digitonin verwendet. Ober Probleme der Stabilität der solubilisierten Enzyme wurde mehrfach berichtet (STAFFORD und BRUMMOND, 1970; TSAI und HASSID, 1971; ALONI et al., 1983; HEININGER, 1983). Der Verlust der Aktivität bei der GT IG, GT IU und GT IIU hängt mit weiteren Schritten der Aufarbeitung zusammen, da Kontrollen bei 4 $^{o}$C auch nach 12 h noch aktiv waren. EIBERBERGER et al. (1985) solubilisierten aus Membranpräparationen von Beta vulgaris mit Hilfe von Digitonin eine UDP-Glucose 1,3:1,4-ß-Glucansynthase, die auch nach Lagerung bei 4 $^{o}$C für eine Woche noch vollkommen aktiv war. Es wurden bisher nur von wenigen erfolgreichen Versuchen berichtet, verschiedene, solubilisierte Glucansynthetasen zu reinigen. TSAI und HASSID (1971) berichteten über die Trennung von ß-1,3- und ß-1,4-Glucansynthetase-Aktivitäten mit Hilfe von Hydroxylapatit. Beide Aktivitäten wurden mit 1 mM UDPG gemessen. HENRY und STONE (1982b) konnten durch Chromatographie über Sepharose 4B und Sephadex G-200 keine Reinigung der Glucansynthetasen erreichen. Mit DEAE-Sepharose erhielten sie eine 10fache Reinigung. Die ß-Glucansynthetasen wurden aber in denselben Fraktionen eluiert. Mit 10 µM bzw. 1 mM UDPG ließen sich aus diesen Fraktionen ß-1,4- bzw. ß-1,3:ß-1,4-Glucane synthetisieren. Mit solubilisiertem Protein wurde kein ß-1,3-Glucan gebildet, wohl aber wenn Membranfraktionen verwendet wurden.

Der Grund dafür, daß bislang nur einmal (TSAI und HASSID, 1971) von einer Trennung verschiedener, solubilisierter Glucansynthetasen berichtet wurde, ist die Instabilität der Enzyme. Eine "unechte" Solubilisierung (Lipid-Protein-Detergens-Komplexe) kann eine Trennung aber ebenso scheitern lassen. Einerseits sind die Komplexe zu groß, um sie über Molekularsieb trennen zu können, andererseits können die Lipide und Detergens-Moleküle bei anderen Trenn-Methoden stören.

Eine gewisse Grundstabilität der Enzyme aus Karottenzellen ist vorhanden, wie die Lyophilisierbarkeit der membrangebundenen Enzyme belegt. Möglicherweise sind aber gewisse Lipidfaktoren für die Aktivität notwendig. Hier bietet der Ansatz von HEININGER (1983), die eine Aktivierung einer solubilisierten ß-1,3-Glucansynthetase durch Lipid beschrieb, vielleicht eine Möglichkeit. Proteine werden möglicherweise unter Verlust ihrer Aktivität solubilisiert und isoliert. Durch Einbau der gereinigten Proteinfraktionen in künstliche Lipid-Vesikel wird dann versucht, wieder eine aktive Glucansynthetase zu rekonstituieren.

Nur mit Digitonin konnten bei der Karotte befriedigende Ergebnisse erzielt werden. Allerdings wurde nicht für alle Detergentien das optimale Membran-Detergens-Verhältnis bestimmt. Durch Triton X-100 wurde zwar ebenfalls eine gute Solubilisierung erzielt, die allerdings von einem hohen Verlust der Enzymaktivitäten begleitet wurde. Digitonin führte dagegen in Konzentrationen, bei denen wenig Protein solubilisiert wurde (bei definierter Membran-Protein-Konzentration) zu einer Aktivierung der GT IU, GT IG und GT IIU. Ähnliche Effekte wurden auch von HENRY und STONE (1982b) beschrieben. HAASS et al. (1981) testeten die in vitro-Synthese von Glucanen in Anwesenheit von Digitonin.

Digitonin hemmt die Glucosylierung von Sterolakzeptoren in Lolium multiflorum (HENRY und STONE, 1982b) und Spinacea oleracea (GARCIA und MUDD, 1980). Bei niederen Substratkonzentrationen könnte die ß-Glucansynthese durch solche Sterol-Glucosyl-Transferasen eingeschränkt werden. Durch die Hemmwirkung von Digitonin wäre eine Konkurrenzreaktion ausgeschaltet. QUANTIN et al. (1980) berichteten, daß Triton X-100 eine Sterol-Glucosyl-Transferase in Zea mays aktiviert. Dies könnte eine Erklärung für die reduzierte ß-Glucansynthese in Anwesenheit von Triton X-100 sein. In Karotten wird aber die GT IIU, die bei hohen Substratkonzentrationen getestet wird, durch Digitonin am stärksten aktiviert, so daß obige Erklä-

rung nicht sehr wahrscheinlich ist. Durch milde Detergens-Behandlung könnten die Membranen auch etwas aufgelockert und durchlässiger werden. Die Substrate gelangen besser an das aktive Zentrum der Glucansynthetasen. Bei zu hohen Konzentrationen an Detergentien wird die Lipid-Protein-Wechselwirkung zu stark gestört, oder die Proteine von Detergens-Molekülen zu stark abgedeckt, und die Synthese wird dadurch blockiert. Die Produkte der Glucansynthetasen aus Membranfraktionen und solubilisierten Fraktionen sind die gleichen, wie durch die Übereinstimmung der PC-Profile der Hydrolyseprodukte belegt wird. Allerdings gibt es gewisse Unterschiede, was die Größe der Produkte betrifft. Hierzu gibt es keine Vergleichsdaten aus der Literatur.

## 6. Die lösliche Glucosyltransferase GT IsU - Beschreibung eines Phänomens

Dieses Enzym unterscheidet sich von den anderen Glucosyltransferasen sehr stark. Der wichtigste Unterschied ist das Produkt. Glucose wird aus UDPG, nicht aber aus GDPG, in ein Ethanol-unlösliches Produkt überführt, aus dem sie durch Behandlung mit Proteasen und der ß-1,3-Endo-Glucanase wieder freigesetzt werden kann. Die Hydrolysebruchstücke sind aber in ihrem Wanderverhalten bei der Papierchromatographie anders als reine Zucker oder deren Oligomere. Bei milder Alkali-Behandlung verbleibt die Glucose im Produkt, was als Hinweis auf eine N-glucosidische Bindung gilt. Es gibt in der Literatur nur wenig Fälle, wo der direkte Transfer von Glucose auf ein Peptid beschrieben wird. In der Regel sind bei solchen Peptid-Zucker-Bindungen N-Acetyl-glucosamin, Galaktose, Arabinose oder Xylose beteiligt (LAMPORT, 1980). Es wäre allerdings möglich, daß die Glucose über bereits vorhandene Zuckerreste an das Peptid geknüpft wird. Dies erscheint insofern wahrscheinlich als N-glucosidische Bindungen bei Glycoproteinen meistens über N-Acetyl-glucosamin und Asparagin gebildet werden, im Testansatz UDPG aber die einzige Zuckerquelle ist. BROWN und KIMMINS (1979) isolierten aus Phaseolus vulgaris ein Hydroxyprolin-armes Glycoprotein, in dem Glucose-Oligomere wahrscheinlich über Arabinofuranosid an das Peptid (Serin und Hydroxyprolin) gebunden sind.

Die Zuckerseitenketten sind sehr kurz. Da in der Methylierungsanalyse sowohl 1,3- als 1,4-Bindungen der Glucose nachgewiesen wurden, kann abgeleitet werden, daß die Seitenketten mindestens zwei Zuckereinheiten enthalten. Ob die beiden Bindungstypen in der gleichen oder verschiedenen Seitenketten vorkommen, ist ungewiß. Die erhöhte Enzymaktivität bei opti-

mierten Testbedingungen (40 $^{o}C$, $ZnCl_2$) führt offenbar nicht zu länger werdenden Seitenketten. Es scheint eher, daß mehr Akzeptorstellen glucosyliert werden würden.

Ebenfalls offen ist die Frage nach dem Akzeptor. Drei Möglichkeiten bieten sich an.

Erstens kann die Glucose durch das Enzym in einer spezifischen Reaktion auf ein Akzeptorpeptid übertragen werden. Dazu muß gewährleistet sein, daß Enzym und Akzeptor während der Aufarbeitung und Reinigung (Zentrifugation, Ammoniumsulfat-Fällung, Gelfiltration) nicht voneinander getrennt werden, was zu einem Verlust des meßbaren Glucosyltransfers führen würde. Die Enzymaktivität ist aber auch noch nach der Trennung über eine AcA 34-Säule meßbar. Der Akzeptor müßte sehr eng mit dem Enzym verbunden sein.

Zweitens könnte die Reaktion ein Präparationsartefakt sein. Eine Glucosyltransferase glucosyliert wahllos in der Fraktion vorhandene Proteine, mit denen sie in vivo möglicherweise auf Grund der Kompartimentierung gar nicht in Kontakt kommt. Die Abbauprofile der Hydrolyseprodukte einer Endo-ß-1,3-Glucanase-Behandlung sind aber gleich, gleichgültig, ob Ammoniumsulfat-gefälltes Protein oder die 20 % Saccharose-Fraktion eines linearen Gradienten im Enzymtest verwendet wurde. Außerdem sollen spezifische Aminosäuresequenzen in der Peptidkette sogenannte "Sequons" vorhanden sein, die den Aminosäurerest, der glycosyliert werden soll, codieren (LAMPORT, 1980). Welche Zucker angeknüpft werden, wird möglicherweise ebenfalls durch diese "Sequons" bestimmt. Die Tatsache, daß lösliche Glucosyltransferase-Aktivitäten vorhanden sind, die 1,3- und 1,4-Bindungen knüpfen, ist dennoch interessant, selbst wenn sie zunächst nur durch eine Artefakt-Reaktion nachzuweisen wären. Die GT IsU konnte übrigens nicht in Baumwoll- und Petersiliekulturen gefunden werden.

Drittens könnte das Enzym selbst der Akzeptor sein. In diesem Fall würde man einen Zuckereinbau auch bei zur Homogenität gereinigtem Enzym erwarten. Die GT IsU und ihr glucosyliertes Produkt sind sehr groß. Sie werden bei einer Trennung über AcA 34 in den selben Fraktionen eluiert. Für eine solche Selbst-Glucosylierung gibt es in der Literatur wenig Belege. TANDECARZ et al. (1975) äußerten die Ansicht, daß bei der Bereitstellung eines Glucoprotein-Primers bei der Stärkesynthese das Enzym selbst als eine Art von Primer agieren könnte. Aus Streptococcus mutans isolierten ROBYT und MARTIN (1983) Glucosyltransferasen, die α-1,6- und α-1,3-Bindungen knüpfen. Die Autoren fanden, daß sowohl Glucose als auch Glucane bei der Synthese kovalent an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden sind. Bei der

Kettenverlängerung soll die Glucose an das reduzierende Ende der Glucankette durch Übertragung der Kette auf das Monomer transferiert werden. Bei der vorliegenden Glucosyltransferase kommt der Umstand hinzu, daß 1,3- und 1,4-Bindungen im Produkt nachgewiesen wurden. Man muß demzufolge auch zwei katalytische Zentren fordern, da die Verknüpfung über 1 → 3 eine andere Orientierung der Substrate erfordert als bei 1 → 4.

Die Glycosylierung von Proteinen verläuft häufig über Lipid-Intermediate (SCHWARZ und DATEMA, 1980; LAMPORT, 1980) durch z. B. en bloc Transfer einer Oligosaccharidkette von einem Glycolipid auf ein Peptid unter Beteiligung von Polyisoprenoid-Lipid Cofaktoren. Bei N-glycosidischen Bindungen erfolgt die Kopplung über N-Acetyl-glucosamin. Die Glycosylierung kann aber auch direkt vom Nukleotidzucker erfolgen (DAVIES und DELMER, 1982).

HOPP et al. (1978) postulierten die Bereitstellung von Vorstufen der Cellulosesynthese unter Beteiligung von Lipid- und Proteinfaktoren bei der Alge Prototheca zopfii. Die Mitwirkung von solchen Lipid-Zwischenstufen scheint im vorliegenden Fall unwahrscheinlich, da mit membranfreien, mit Ammoniumsulfat gefällten Proteinfraktionen gearbeitet wurde. Auch ist das Produkt unlöslich in Methanol-Chloroform.

Bei der Stärkesynthese in Kartoffeln beschrieben LAVINTMAN et al. (1974) und TANDECARZ et al. (1975) den Transfer von Glucose aus UDPG auf ein Protein, welches als Primer für die Verlängerung der Glucankette dient. Der Zucker ist O-glucosidisch gebunden. Sie beschrieben eine lösliche und eine sedimentierbare Form des Enzyms mit verschiedenen Eigenschaften. Bei längeren Inkubationszeiten wurde der Kohlehydratanteil aus dem Glucoprotein freigesetzt und wurde TCA-löslich aber Ethanol-unlöslich.

Eine ähnliche Ablösung der markierten Zuckerreste vom Ethanol-unlöslichen Produkt bei längeren Inkubationszeiten wurde im Karottensystem ebenfalls beobachtet. Der abgelöste Zuckeranteil war jedoch Ethanol-löslich. Bei Anwesenheit von $ZnCl_2$ im Testansatz war das Produkt stabiler. α-Amylase konnte die eingebauten Glucosylreste nicht wieder freisetzen. Dies könnte aber auch mit der mangelnden Zugänglichkeit der Glucosylreste für die Amylase erklärt werden.

Über mögliche Funktionen des Glucoproteins kann in diesem Stadium nur spekuliert werden. Ist es ein Artefakt oder aber bei der Bildung von

Primern der Glucansynthese beteiligt? Es gibt immer wieder Hinweise in der Literatur, daß bei der Glucansynthese Glucoproteine beteiligt sein könnten (Übersichtsartikel von LAMPORT, 1980; DAVIES und DELMER, 1982; MACLACHLAN, 1982). Ist es eine unvollständige Zwischenstufe in der Synthese eines Glycoproteins mit heterogenem Zuckeranteil? Die Funktionen von Glycoproteinen sind vielfältig. Sie spielen eine Rolle als Reserveproteine, als Strukturbildner, als Enzyme, Rezeptoren, Toxine (Ricin), Schmiermittel und Lectine, um nur einige Möglichkeiten aufzuzählen (LAMPORT, 1980).

Mit den vorliegenden Daten kann man sich folgendes Bild der GT IsU und deren Produkt machen: Die Glucose wird kovalent auf ein Peptid übertragen und an eine Aminosäure oder einen bereits vorhandenen Zucker gebunden. Sowohl das Enzym als auch der Akzeptor sind löslich und möglicherweise identisch oder sehr eng gebunden. Die Glucosyl-Seitenketten sind sehr kurz und nicht abbaubar durch α-Amylase, Exo-ß-1,3-Glucanase und wenig durch Endo-ß-1,4-Glucanase. Es kommen mehr 1,4-glucosidische Bindungen vor als 1,3-Bindungen. Die Endo-ß-1,3-Glucanase kann das Produkt teilweise angreifen. Ihre Wirksamkeit ist höher bei Produkt, das unter optimierten Bedingungen hergestellt wurde. Die Hydrolyse-Fragmente konnten jedoch nicht als Cellobiose oder Laminaribiose identifiziert werden. Der Einbau von Glucose ist abhängig von der Temperatur und der Anwesenheit gewisser zweiwertiger Ionen. Auch bei optimierten Testbedingungen verschwindet die Proteinase-Labilität nicht. Dies bedeutet, daß die Glucanketten nicht lang genug werden, um in Ethanol-unlöslich zu sein. Die Größe des Enzyms und des Produktes liegt bei einem Molekulargewicht von 300000. Der Einbau von Glucose wird durch UDP/UTP stark gehemmt. Ebenso hemmend wirken UDP-Gal und UDP-Xyl, nicht jedoch GDP-Man und UDP-GlucNac. Das Enzym ist in Zellextrakten zum Teil löslich und kann mit Salz-Lösungen leicht aus Membranfraktionen herausgewaschen werden. In linearen Saccharose-Gradienten findet man es nach 15 h Laufzeit bei 20 % (w/w). In diesem Bereich sind Leitenzyme für Tonoplast, Golgi-Membranen und Plasmalemma nicht nachweisbar. Digitonin hat keine Auswirkungen auf die Enzymaktivität, und das Produkt ist unlöslich in Chloroform-Methanol. Die Beteiligung von Lipiden ist daher unwahrscheinlich.

## 7. Substrate der ß-1,4-Glucansynthetasen

Es wurde bereits erwähnt, daß sowohl UDPG wie auch GDPG als Substrate bei der in vitro-Synthese von ß-1,4-Glucanen verwendet wurden, meistens aber in

verschiedenen Objekten. In isolierten Baumwollfasern wird GDPG wahrend der Elongationsphase als Substrat für die Synthese von β-1,4-Glucanen verwendet, wohingegen in späteren Phasen, in denen die Sekundärwandsynthese abläuft, UDPG das bevorzugte Substrat ist (DELMER, 1977). In Lolium multiflorum (HENRY und STONE, 1982a) wurden mit GDPG nur β-1,4-Glucane mit UDPG auch Mischglucane synthetisiert. Glucose aus GDPG wurde dabei schlechter eingebaut.

In der Karotte erhält man ebenfalls mit beiden Substraten β-1,4-Glucane. GDPG ist hier das bessere Substrat. Es stellt sich die Frage, ob zwei verschiedene Enzyme mit unterschiedlicher Substratspezifität und Funktion vorliegen, oder ob nur ein Enzym vorhanden ist, das beide Substrate verwerten kann. Im Verlauf der Charakterisierungsversuche wurde der Einfluß verschiedener Parameter auf die Glucosyltransferase mit UDPG und GDPG als Substrat untersucht. In den meisten Fällen verhielten sich die GT IU und GT IG gleich. Es gab allerdings auch Unterschiede. So ist z. B. die Größe und die Säurestabilität der Produkte verschieden. GT IU wird durch $MnCl_2$ stärker gefördert als GT IG. Es gibt Unterschiede in der Reaktion auf GDP/GTP und UDP/UTP sowie andere Nukleotidzucker. Und das Verhältnis der Enzymaktivität von GT IU und GT IG gemessen aus verschiedenen Fraktionen ist nicht konstant. Diese Unterschiede sind aber alle nicht ausreichend, um die Existenz von zwei getrennten Enzymen zu postulieren. Sie lassen sich mit der Verschiedenartigkeit der Substrate und der damit verbundenen unterschiedlichen Affinität zum Enzym, was sich in der app. $K_m$ ausdrückt, erklären. Außerdem ist unter den Bedingungen der GT IU auch die lösliche GT IsU teilweise aktiv, was ebenfalls gewisse Unterschiede erklären kann. Für die Hypothese, daß UDPG bei der Bildung eines Xyloglucans beteiligt ist, gab es keine Belege. UDP-Xylose bewirkt eine Hemmung und keine Steigerung des Glucoseeinbaus aus UDPG. Die beiden Aktivitäten ließen sich im linearen Dichtegradienten nicht trennen. Es wurden auch keine Bedingungen gefunden, in denen nur eine der beiden Aktivitäten arbeitete.

Der Einbau von Glucose aus dem einen Substrat wird durch das andere Substrat beeinflußt, aber nicht vollständig unterbunden. Möglicherweise gibt es eine partielle Hemmung, der Einbau von Glucose aus beiden Substraten, läuft aber weiter. Man müßte unterschiedlich markierte Glucose in Form von UDPG und GDPG anbieten und in dem zur Homogenität gereinigten Produkt untersuchen, ob beide markierten Glucosemonomere enthalten sind. Auf Grund der vorliegenden Daten ist es wahrscheinlich, daß ein einziges Enzym für

den Glucoseeinbau aus UDPG und GDPG verantwortlich ist. Das "richtige" Substrat wäre dann GDP-Glucose. Mit diesem Zucker-Nukleotid erhält man keinen Einbau von Glucose bei Verwendung von Petersilie. Bei Baumwollzellen mißt man einen Einbau, der dem der GT I UDPG aus Karottenzellen entspricht. Wenn es sich aber um ein einziges Enzym handelt, bleibt die Frage: Stellt dieses Enzym ß-1,4-Glucan-Oligomere her, die in verschiedenen Substanzen auftauchen, oder gibt es weitere unerkannt gebliebene ß-1,4-Glucansynthetasen? Mit millimolaren Konzentrationen an GDPG konnte bei verschiedenen Bedingungen kein Einbau von Glucose gemessen werden.

8. Glucosyltransferasen IG und IU und Glucomannansynthese

Vor 21 Jahren gelang es erstmals mit Extrakten von höheren Pflanzen eine in vitro-Synthese von ß-1,4-Glucanen zu erzielen (BARBER et al., 1964). Als Substrat wurde GDP-Glucose verwendet. GDPG wurde lange Zeit als Substrat der Cellulosesynthese bei höheren Pflanzen angesehen. Inzwischen gibt es eine Vielzahl von Berichten, in denen bei den verschiedenen Objekten mit UDP-Glucose eine in vitro-Synthese von ß-1,4-Glucanen erzielt wurde (Übersichtsartikel: DELMER, 1977 und 1983; ROBINSON und QUADER, 1981). Die Frage, welches der beiden Zuckernukleotide das Substrat bei der Cellulosesynthese ist, ist noch nicht entschieden, obwohl zur Zeit eher UDP-Glucose favorisiert wird. Eine Reihe von Daten sprechen gegen GDP-Glucose. Der Gehalt an GDPG ist in den meisten Pflanzen sehr niedrig, wogegen große UDPG-Pools gefundene werden (CARPITA und DELMER, 1981). Die Synthese-Kapazität für GDPG (Aktivität einer GDPG-Pyrophosphorylase) scheint in den meisten Pflanzen sehr gering zu sein (DELMER, 1983).

GDP-Glucose wurde die Rolle als Substrat bei der Bildung von Glucomannanen in Phaseolus aureus (ELBEIN, 1969; VILLEMEZ, 1971) und Pisum sativum (BRETT, 1981) zugesprochen. Glucomannane sind allerdings in Primärzellwänden nicht stark vertreten (DELMER, 1983). Der Gehalt an Mannose in isolierten Zellwandfraktionen aus Karotten ist verglichen mit anderen Zuckern sehr gering (ASAMIZU und NISHI, 1979; SASAKI, 1983). EDA et al. (1985) isolierten aus Nicotiana tabacum-Suspensionszellen ein Galaktoglucomannan mit etwa gleichen Anteilen der drei Zucker. Das Polysaccharid ist löslich in 24 % NaOH. Mannose und Glucose sind alternierend ß-1,4-glucosidisch verknüpft. Galaktose ist als Mono- oder Disaccharid an Mannose gebunden.

Der Glucoseeinbau aus GDPG ist bei Extrakten aus der Karotte nur 1 - 2

Minuten linear. In Anwesenheit von GDP-Mannose läuft der Einbau von Glucose über längere Zeit linear weiter. Der Gesamteinbau an Glucose wird durch GDP-Man gesteigert, die anfängliche Einbaurate aber gedrosselt. Eine Stimulierung des Glucoseeinbaus durch GDP-Man wurde bereits von ELBEIN (1969), VILLEMEZ (1971) und BRETT (1981) beschrieben. Mit Enzymextrakten der Karotte konnte der gleiche Effekt erzielt werden, wenn UDP-Glucose als Substrat angeboten wurde. Dazu war es aber notwendig, die Testzeiten auf über 10 Minuten auszudehnen. Die Reaktion war auch nach 40 Minuten noch linear. Wurde dagegen GDP-Mannose als radioaktiv markiertes Substrat vorgelegt, fand man keinen fördernden Einfluß durch UDPG, wohl aber durch GDPG. Andere Zuckernukleotide, auch UDP-Xylose, zeigten diese stimulierende Wirkung nicht. Wird nur GDP-Man im Test angeboten, findet ein Einbau von Mannose statt. Die Enzyme GT IU, GT IG und GT GDP-Man sind alle in Membranen der gleichen Dichte lokalisiert (Golgi-Membranen). Die Aktivität der GT IG ließ sich durch GDP-Man auch bei solubilisierten Proteinfraktionen beeinflussen. HELLER und VILLEMEZ (1972) solubilisierten ebenfalls ein Transferasesystem, in dem der Einbau von Glucose aus GDPG eine kurzlebige Reaktion war, die aber durch GDP-Man verlängert werden konnte. In dem solubilisierten System aus der Karotte ist der Einfluß von GDPG auf den Einbau von Mannose aber nicht so groß wie bei der Verwendung von Membranfraktionen.

Einige Unterschiede zu dem von ELBEIN (1969) beschriebenen System sind allerdings festzuhalten. Der Einbau von Glucose aus GDPG ist hoch und nicht niedrig. UDPG kann GDPG teilweise ersetzen, und der Einbau von Glucose ist abhängig von $Mg^{2+}$. Der Einbau von Mannose aus GDP-Man wird durch GDPG nicht gehemmt, sondern gesteigert, und die Produkte sind größtenteils Alkali-löslich. In diesem Punkt herrscht schon eher Übereinstimmung mit den Daten von BRETT (1981), der ein Produkt fand, das zu 88 % löslich war in 4,4 M NaOH und dessen Synthese durch Inhibitoren der Cellulosesynthese nicht gehemmt wurde.

$^{14}$C-Glucose-markierte Produkte der GT IU und GT IG wurden sowohl in ihrer Größe als auch in ihrer Zusammensetzung durch GDP-Mannose verändert. Das gleiche Ergebnis erhielt man, wenn die Produkte durch $^{14}$C-Mannose unter Anwesenheit von GDP-Glucose markiert wurden. Die PC-Profile der enzymatisch freigesetzten Hydrolysefragmente aus den Produkten von GT IG + GDP-Man und GT GDP-Man + GDPG sind identisch. Es wurde offensichtlich ein gemeinsames Produkt gebildet. Auch mit UDP-$^{14}$C-Glucose bewirkte GDP-Man diese Änderung des Produktes. Im Alkali-löslichen Anteil von Produkten, die von GT IU

und GT IG bei Anwesenheit von GDP-Man gebildet wurden, findet in beiden Fällen eine Verschiebung zu größeren Produkten statt. Es bleibt allerdings auch ein Rest Alkali-unlöslich, der bei GDP-Man-Anwesenheit erhöht ist. BRETT (1981) fand ebenfalls einen Alkali-unlöslichen Anteil in seinem System, den er in Zusammenhang mit einer in vitro-Cellulosesynthese sah. DELMER (1977) wies aber darauf hin, daß die Alkali-Unlöslichkeit einer Substanz kein Beweis für Cellulose ist. Die Größenverhältnisse im Alkali-löslichen Anteil des mit GDP-Man synthetisierten Mannans werden durch GDPG ebenfalls zugunsten größerer Produkte verschoben. Der Zeitverlauf der GT IG-Aktivität bei verschiedenen Mengen an eingesetztem Protein deutet an, daß das Enzym bereits existierende Ketten vervollständigt und daß die Konzentration des Akzeptors die Höhe des Plateaus bestimmt. DELMER (1977) konnte eine Verschiebung des Plateaus durch Zugabe von gekochtem Extrakt erzielen.

Nach Vorinkubation der Enzymfraktion mit GDP-Man läuft die Synthese über längere Zeit weiter. Dafür können die gebildeten Mannan-Oligomere oder noch vorhandene GDP-Mannose verantwortlich sein. Wenn der Einbau von Glucose aus GDPG aber bereits abgebrochen ist, kann durch Zugabe von GDP-Man kein weiterer Einbau von Glucose induziert werden. Der fördernde Einfluß von GDP-Man kann sich nur auswirken, wenn die Glucansynthese noch in Gang ist. Andererseits wird Mannose aus GDP-Man trotz Vorinkubation der Extrakte mit GDPG noch in das Produkt eingebaut.

Alle Ergebnisse deuten darauf hin, daß in diesem System ein gemeinsames Produkt, ein Glucomannan, gebildet wird. Die beiden enzymatischen Aktivitäten sind aber teilweise autonom. Die genaue Struktur des Glucomannans ist nicht bekannt. Wird im Test nur ein Substrat angeboten, so wird ein ß-1,4-Glucan bzw. ein Mannan, das auch von der Endo-ß-1,4-Glucanase abgebaut wird, gebildet. Die Substrate üben einen wechselseitigen Einfluß aus bezüglich der Enzymaktivität, des Gesamteinbaus, der Kinetik und den gebildeten Alkali-löslichen Produktanteilen. Eine Beteiligung endogener Kohlehydratketten ist nicht ausgeschlossen. Für die vollständige Charakterisierung des Produktes müßte es unter Beteiligung von verschieden markierten Zuckern hergestellt und vor der Analyse gereinigt werden, oder beide markierten Zucker in gleichen Hydrolyse-Bruchstücken nachgewiesen werden.

9. Beeinflussung der Glucosyltansferasen in in vivo-Versuchen

Die Bildung der Zellwand ist eine sehr komplexe Syntheseleistung, die von der Zelle gut reguliert werden muß. Durch Eingriffe in das in vivo-Geschehen kann man unter günstigen Umständen Einblicke in einzelne Teilbereiche bekommen.

Phytohormone spielen beim Wachstum und der Differenzierung von Pflanzenzellen eine große Rolle. In kompetenten Geweben wird durch Auxin ein Streckungswachstum der Zellen induziert. In Vigna angularis setzt nach Behandlung mit IAA eine Elongation in der apikalen Region ein (NISHITANI und MASUDA, 1982). Bekannt sind auch die Wirkungen auf das Streckungswachstum von Koleoptilen bei Zea mays und Avena sativa. Die Anwesenheit von Auxin und Cytokinin ist eine wesentliche Voraussetzung für die Bildung von tracheidalen Elementen bei in Suspension kultivierten Mesophyllzellen von Zinnia elegans (FUKUDA und KOMAMINE, 1980). Einflüsse von Phytohormonen auf die Zusammensetzung der Zellwand wurden mehrfach an verschiedenen Objekten wie Vigna angularis, Pisum sativum, Daucus carota, Avena sativa von NISHITANI und MASUDA (1982), ABDUL BAKI und RAY (1971), ASAMIZU et al. (1983), YAMAMOTO und MASUDA (1984) untersucht. Auch Auswirkungen von Auxin auf die Glucansynthetasen wurden gefunden. WALTON und RAY (1982) untersuchten den Einfluß von Licht und Auxin auf die Aktivität der GS I bei Zea mays. Sie fanden eine Hemmung der GS I-Aktivität durch Licht, die sich durch exogen appliziertes Auxin verhindern ließ. RAY (1973a,b) berichtete von einer Hormon-induzierten (Auxin) Aktivierung einer bereits existierenden Glucansynthetase in Erbsen.

Nach PRAT et al. (1984) kommt auch $Ca^{2+}$ eine gewisse Rolle bei den Vorgängen des Streckungswachstums zu. Die Autoren fanden bei Vigna radiata, daß geringe Konzentrationen von $Ca^{2+}$ ( $< 1$ mM) die spontane und durch IAA induzierte Elongation ohne lag-Phase inhibieren bei gleichzeitiger Stimulierung der Protonenexkretion. BAYDOUN und BRETT (1984) berichteten, daß $Ca^{2+}$ bei Erbsenkeimlingen die Wandstreckung inhibiert und daß die Bindungskapazität der Zellwand für $Ca^{2+}$ bei pH-Werten unter 6 erniedrigt ist. QUADER und ROBINSON (1979) wiesen darauf hin, daß in Oocystis die Cellulosesynthese durch die Calcium-Inophore A23187, X537A, Dianemycin sowie durch die Chelatoren Chlorotetracyclin und in geringerem Maße durch EDTA unterbunden wurde. KÖHLE et al. (1985) fanden eine Stimulierung der im Plasmalemma lokalisierten GS II durch $Ca^{2+}$ bei Glycine max. Eine Betei-

ligung von $Ca^{2+}$ bei Prozessen der Zellelongation wurde in vielen Fällen nachgewiesen. Neben einer direkten Wirkung auf Zellwandenzyme, werden auch Wechselwirkungen von Calcium mit Zellwand-Polymeren (Pektine, Glycoproteine) diskutiert (Obersichtsartikel von TAIZ, 1984). Die ausgewählten Literaturbeispiele deuten bereits an, wie vielfältig die Regulationsmechanismen sein können. Man sollte allerdings Streckungswachstum und Zellteilungswachstum bei diesem Problemkomplex streng unterscheiden.

In der Karotte beeinflußten $GA_3$ und $LaCl_3$ vor allem die ß-1,3-Glucansynthetase. In beiden Fällen wurde eine Erhöhung der spezifischen Aktivität bei Inkubation der Zellen mit dem Effektor festgestellt.

NDA bewirkt, daß sowohl die Aktivität der GT IU als auch die der GT IIU reduziert wird. Im in vitro-Test ist NDA dagegen unwirksam. NDA greift möglicherweise in den Gibberellinstoffwechsel ein. Bestimmte Zwergmutanten von Reis, die nur geringe Gibberellingehalte aufweisen, lassen sich durch exogene Gibberellinzufuhr zu normalenem Wuchs bringen. Bei normalem Reis läßt sich ein durch NDA erzeugter Zwergwuchs durch Applikation von Gibberellin kompensieren (RADEMACHER et al., 1983). Eine Wirkung über den Sterolmetabolismus wird ebenfalls diskutiert. GROSSMANN et al. (1985) fanden, daß der hemmende Effekt auf die Zellteilung von NDA (= Tetcyclacis) in Suspensionskulturen von Zea mays und Glycine max durch Zugabe von Cholesterol neutralisiert wurde.

Ob die erzielten Effekte durch NDA, $GA_3$ und $LaCl_3$ in einem regulatorischen Zusammenhang stehen, bleibt noch zu prüfen.

## 10. Perspektiven

Es ist bis heute nicht gelungen, eine Synthese von fibrillärer Cellulose in vitro zu erzielen. Die Synthese von ß-Glucanen aus Membran- und teilweise auch aus solubilisierten Fraktionen gelang bei einer Reihe von Objekten. Die Schwierigkeit liegt allerdings darin, daß man nie genau weiß, wieviele Enzyme bei solchen in vitro-Synthesen beteiligt sind und in welchen Membranen diese Enzyme in vivo vorkommen, da die Produkte oft heterogen sind und mit Inaktivierung einzelner Aktivitäten durch den Zellaufschluß gerechnet werden muß. Eine Solubilisierung dieser Enzyme ist daher von größtem Interesse, führt aber in den meisten Fällen zu inaktiven oder sehr labilen Enzympräparationen. Die Forschung in dieser Richtung kommt nur langsam

voran. Ein Fortschritt wäre vielleicht möglich, wenn sich die solubilisierten Proteine durch Zugabe von definierten Lipidpräparationen oder durch Integration in künstliche Vesikel in ihrer Aktivität rekonstituieren ließen.

Erfolgversprechend scheinen auch zwei andere Ansätze zu sein:

1. Man isoliert mRNA aus Systemen, die eine Synthese der Enzyme erwarten lassen, z. B. zellwandregenerierende Protoplasten, und stellt damit in vitro Produkte her, gegen die man Antikörper produziert. Diese Antikörper werden nun durchgetestet, ob sie auf die Glucansynthese in vivo und in vitro einen Einfluß ausüben. Findet man einen solchen Antikörper, kann man möglicherweise auch inaktivierte Glucansynthetasen oder Vorstufen aufspüren. Ein Problem bei diesem Ansatz ist sicher die Bereitstellung von genügend Ausgangsmaterial, um ausreichende Mengen Protein für die Antikörperherstellung synthetisieren zu können.
2. Durch Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen gereinigte Membranfraktionen und anschließendem Screening könnte man ebenfalls zu spezifischen Werkzeugen für die Untersuchung der Zellwandsynthese gelangen. SMITH et al. (1984) stellten bereits solche monoklonalen Antikörper gegen ein Zellwandprotein von Chlamydomonas her.

In jedem Fall ist es unbedingt notwendig, daß die Enzymaktivitäten im verwendeten System so ausführlich wie möglich charakterisiert sind.

Vielleicht bietet sich auch die Gelegenheit über Mutanten, die erhöhte oder erniedrigte Aktivität an der Zellwandbildung beteiligter Enzyme aufweisen, zu weiteren Erkenntnissen über die Zellwand und ihrer Synthese zu gelangen. Ansätze zu solchen Versuchen sind ebenfalls schon vorhanden. CATT (1981) berichtete über die Isolierung von Zellwand-Mutanten von höheren Pflanzen unter Verwendung von Suspensionskulturen.

Auf die Schwierigkeiten in der Zellwandforschung wiesen die Zitate zu Beginn der Arbeit hin. Ein Bild der Vorgänge bei der Synthese und Strukturausbildung der Zellwand setzt sich nur langsam aus vielen Einzeldaten zusammen. Am besten beschrieben wird die Arbeit eines jeden, der sich mit dieser Problematik befaßt, durch folgende "repetitive Sequenz" aus einem "Song" von Pink Floyed (1979):

"All in all it´s just another brick in the w a l l ".

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von ß-Glucanen in zellfreien Systemen wurde untersucht. Verschiedene Glucosyltransferasen wurden isoliert, charakterisiert, partiell gereinigt und solubilisiert. Die Charakterisierung der Enzyme schloß eine Optimierung der Testbedingungen bezüglich der selektiven Messung verschiedener Glucosyltransferasen aus Rohhomogenaten oder partiell gereinigten Fraktionen ein. Die in vitro gebildeten Produkte der Glucosyltransferasen wurden ebenfalls charakterisiert.

1. Die Ergebnisse der Versuche führten zur Unterscheidung von vier Enzymaktivitäten, die sich durch ihre Anforderungen an Ionen, an das Substrat, dem Verhalten gegenüber Nukleotiden, anderen Nukleotid-Zucker, Hemmstoffen und anderen Effektoren charakterisieren ließen. Sie akkumulierten in linearen Saccharose-Gradienten an Stellen unterschiedlicher Dichte und unterschieden sich in den von ihnen synthetisierten Produkten.

   Glucosyltransferase I mit UDPG und mit GDPG: Diese beiden Enzymaktivitäten verhielten sich bei der Charakterisierung in vielen Fällen gleich. Die meisten Daten deuten darauf hin, daß es sich bei GT IU und GT IG um das gleiche Enzym handelt, das unterschiedliche Affinität zu den beiden Substraten UDPG und GDPG besitzt. Beide Aktivitäten sind membrangebunden und akkumulierten bei 29 - 31 % (w/w) Saccharose (Golgi-Membranen) in linearen Gradienten. Ohne die Zugabe exogener Ionen waren beide Enzymaktivitäten inaktiv. Sie wurden aktiviert durch $Mg^{2+}$ oder $Mn^{2+}$ und arbeiteten noch optimal bei hohen $MgSO_4$-Konzentrationen (100 mM). Der Einbau von Glucose wurde durch das Alternativ-Substrat nur partiell gehemmt, wobei GDPG effektiver war. Die app. $K_m$ für GDPG lag bei 1 - 2 µM. Für UDPG ließ sie sich nur schwer bestimmen, da mit steigender Substratkonzentration, der Einbau an Glucose zunahm (app. $K_m$ 0,01 - 0,9 mM). Von beiden Aktivitäten wurden ß-1,4-glucosidische Bindungen geknüpft. Das Produkt der GT IG war aber homogener, und der Anteil an höhermolekularen Glucanketten war größer. In beiden Ansätzen hatte die Anwesenheit von GDP-Mannose Einfluß auf die Produktbildung und das Produkt selbst (Größe, Hydrolysefragmente), die Effekte waren aber mit GDP-Glucose als Substrat viel deutlicher. Die Funktion dieser Enzymaktivität ist in Zusammenhang mit der Glucomannansynthese zu sehen. Neben den Gemeinsamkeiten gab es auch einige Unterschiede, die teilweise

aber auch auf die unterschiedlichen Substrate und deren Affinität zum Enzym zurückzuführen sind. So war z. B. der Einfluß von Nukleotiden, anderen Zucker-Nukleotiden, das Ausmaß der Wirkung von Ionen und anderen Effektoren verschieden. Ferner war das Verhältnis der Aktivität von GT IU zu GT IG in verschiedenen Fraktionen nicht konstant, und in Petersilie konnte man unter gleichen Bedingungen keine GT IG, in Baumwolle keine GT IU messen. Die Möglichkeit, daß die GT IU bei Karotten ein der GT IG benachbartes Enzym mit sehr ähnlichen Eigenschaften ist, kann aber nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Glucosyltransferase II mit UDPG: Bei 38 - 40 % Saccharose (Plasmalemma) akkumulierte ein Enzym, das bei millimolaren Substratkonzentrationen (app. $K_m$ 1,5 mM) ohne die exogene Zugabe von Ionen arbeitete. Es war aber ebenfalls abhängig von zweiwertigen Kationen wie die Inaktivierung durch EDTA und EGTA zeigte. Dieses Enzym wurde durch $CaCl_2$ (1 mM) und Cellobiose (> 10 mM) stimuliert, was auf eine Erniedrigung der app. $K_m$ bei gleichzeitiger Steigerung der app. Vmax zurückzuführen ist. Andere Ionen ($Zn^{2+}$, $Mn^{2+}$) führten zu einer Hemmung. Es unterschied sich sehr deutlich von den GT I-Aktivitäten bezüglich des Einflusses verschiedener Effektoren. Das Produkt konnte als ß-1,3-Glucan identifiziert werden, das in KOH und DMSO löslich war und bei einer Sephadex G-75-Säule im Ausschlußvolumen (Trennbereich 1000 - 50000) eluiert wurde.

Glucosyltransferase Is mit UDPG: In löslichen Überstandsfraktionen und Membransedimenten fand sich eine Glucosyltransferase, die ebenfalls UDPG als Substrat verwertete (app. $K_m$ 0,6 µM). Das Enzym ließ sich durch Salz- oder Digitonin-Behandlung auch aus den Membranfraktionen in Lösung bringen. Es arbeitete optimal bei Bedingungen, unter denen die anderen Enzyme nicht arbeiteten (40 °C; $ZnCl_2$ 1 mM) und wurde sehr stark gehemmt durch UDP/UTP und EDTA/EGTA. In linearen Saccharose-Gradienten fand sich die Aktivität je nach Laufzeit im "overlay" und/oder bei 15 - 20 % Saccharose. Die Enzymaktivität konnte mit Ammoniumsulfat gefällt werden (30 - 35 % Sättigung), und ein Molekulargewicht um 300000 wurde ermittelt. Das Produkt der Enzymreaktion war genauso groß und ist ein Glucoprotein. Die glucosidischen Bindungen waren stabil gegen milde Alkali-Behandlung und gegen Kochen in TCA (5 %) und SDS. Es wurden sowohl 1,3- als auch 1,4-Bindungen in den Glucosyl-Seitenketten, die sehr kurz sind, gefunden. Die eingebaute Radioaktivität konnte aus dem Produkt durch Proteasen und einer ß-1,3-Endo-Glucanase-Präparation frei-

gesetzt werden, nicht jedoch durch α-Amylase und eine β-1,3-Exo-Glucanase-Präparation.

2. Es konnte keine signifikante Wirkung von in vivo-Hemmstoffen der Cellulosesynthese (Coumarin und 2.6.DCB) auf die Enzyme festgestellt werden. Hemmstoffe der β-1,3-Glucansynthese in gewissen Pilzen (TH-Echinocandin B und TH-Echinocandin B-(2-aminoaethyl)aether bewirkten bei der β-1,3-Glucansynthetase (GT IIU) eine Stimulierung um das 2- bis 2,5fache. Alle vier Enzyme wurden durch Calcofluor white gehemmt.

3. Eine schnell wachsende Suspensionskultur der Karotte wurde in bezug auf Wachstum, Proteingehalt sowie Aktivität der Glucosyltransferasen charakterisiert. Die Enzymaktivitäten sind am höchsten während der Wachstumsphase und nehmen danach ab. Nur die GT IsU hat ihre höchste Aktivität in der stationären Phase.

4. Mit Homogenaten aus Petersilie- und Baumwoll-Zellen stehen Enzymquellen zur Verfügung, die unter den gegebenen Bedingungen hohe spezifische Aktivitäten der GT IIU aufweisen, bei sehr geringen oder nicht meßbaren Aktivitäten der GT IU, GT IG und GT IsU.

5. Zellen, die in Anwesenheit von $GA_3$ und $LaCl_3$ kultiviert wurden, hatten höhere in vitro-Aktivitäten der GT IIU (β-1,3-Glucansynthetase). Bei Kultivierung der Zellen mit dem Wachstumsmodulator NDA (Tetcyclacis) wurde das Wachstum der Zellen reversibel gestoppt. Sowohl die Aktivität der GT IU als auch die der GT IIU aus solchen Zellen waren reduziert. Im in vitro-Test hatte NDA keine Wirkung. Diese Ergebnisse sind Grund genug, die mögliche Rolle von $GA_3$ und $Ca^{2+}$ bei der Regulation der β-1,3-Glucansynthese genauer zu untersuchen. NDA ließe sich vielleicht für die Synchronisation von Zellkulturen verwenden.

6. Die vier Enzymaktivitäten wurden über differentielle Zentrifugation und lineare Gradienten getrennt. Die GT IsU war von Membranen ablösbar und leicht von den anderen membranintegralen Enzymen zu trennen. Die GT IIU sedimentierte bereits vollständig bei 14000g und akkumulierte bei einer Dichte von 1,17 $g.cm^{-3}$ (Plasmalemma). Die GT IU und GT IG waren auch noch nachweisbar in Sedimenten zwischen 14000 - 60000g. Sie sind in Membranen lokalisiert mit einer Dichte von 1,13 $g.cm^{-3}$ (Golgi-Membranen).

7. Die Glucosyltransferasen IU, IG und IIU wurden durch Digitonin in Konzentrationen, bei denen noch keine Solubilisierung von Protein erfolgte, gesteigert. Die GT IsU blieb unbeeinflußt. Alle membranintegralen Enzyme sind so in den Membranvesikeln orientiert, daß ihre Aktivität durch Behandlung mit Trypsin herabgesetzt wird. Bei Membranfraktionen, bei denen die Glucosyltransferasen durch Trypsin-Behandlung inaktiviert wurden, konnte man nach Behandlung der Membranen mit Digitonin und Filipin wieder einen geringen Anteil der GT IIU messen. Die GT IG blieb inaktiv.

8. Die Rolle der GT IG und der GT IU bei der Glucomannan-Synthese wurde untersucht. Mit UDPG oder GDPG als Substrat wurde ein ß-1,4-Glucan gebildet. Mit GDP-Mannose wurde ein Mannan gebildet, das hydrolysierbar war durch die ß-1,4-Endoglucanase. Waren beide Substrate im Testansatz enthalten, wurde ein Produkt gebildet, das sich von dem Glucan und dem Mannan unterschied. Die Profile der Hydrolysefragmente des gemeinsamen Produktes (Papierchromatographie) mit GDPG und GDP-Man waren identisch, gleichgültig, ob Glucose oder Mannose als radioaktiv markiertes Monomer eingebaut wurde.

9. Alle Membran-integralen Glucosyltransferasen konnten durch Behandlung mit Digitonin in einen 126000g Überstand überführt werden (20 - 40 % der Gesamtaktivität). Diese "solubilisierten" Enzyme synthetisierten die gleichen Produkte wie die membranintegralen. Die Elutionsprofile der KOH-löslichen Produktanteile zeigten aber, daß eine leichte Verschiebung zu kleineren Produkten stattfand. Die solubilisierten Enzyme konnten bei -70 $^{o}$C gelagert werden, wurden aber bei weiteren Trennschritten über Molekularsiebe inaktiv.

## VI. LITERATUR

Abdul-Baki, A.A., Ray, P.M. (1971): Regulation by auxin of carbohydrate metabolism involved in cell wall synthesis by pea stem tissue. Plant Physiol. 47, 537-544.

Albersheim, P., McNeil, M., Labavitch, J.M. (1977): I. The wall of growing cells. 1. The molecular structure of the primary cell wall and elongation growth. In: Plant Growth Regulation, P.E. Pilet (Ed.), 1-12.

Alexander, W.J., Mitchell, F.L. (1949): Rapid measurement of cellulose viscosity in the nitration method. Anal. Che. 21, 1497-1500.

Alfermann, W., Reinhard, E. (1971): Isolierung anthocyanhaltiger und anthocyanfreier Gewebestämme von Daucus carota: Einfluß von Auxinen auf die Anthocyanbildung. Experimentia 27, 353-354.

Aloni, Y., Delmer, D.P., Benziman, M. (1982): Achievement of high rates of in vitro synthesis of 1,4-ß-D-glucan: Activation by cooperative interaction of the Acetobacter xylinum enzyme system with GTP, PEG and a protein factor. Proc. Natl. Acad. Sci. 79, 6448-6452.

Aloni, Y., Cohen, R., Benziman, M., Delmer, D.P. (1983): Solubilization of the UDP-Glucose: 1,4-ß-D-glucan 4-ß-D-glucosyltransferase (cellulose synthase) from Acetobacter xylinum. A comparison of regulatory properties with those of the membrane bound form of the enzyme. J. Biol. Chem. 258, 4419.

Amino, S., Takeuchi, Y., Komamine, A. (1984): Changes in cell wall constituents during the cell cycle in a synchronous culture of Catharanthus roseus. Physiol. Plant. 60, 326-332.

Asamizu, T., Nishi, A. (1979): Biosynthesis of cell wall polysaccharides in cultured carrot cells. Planta 146, 49-54.

Asamizu, T., Nishi, A. (1980): Regenerated cell wall of carrot protoplasts isolated from suspension-cultured cells. Physiol. Plant. 48, 207-212.

Asamizu, T., Nakano, N., Nishi, A. (1983): Changes in noncellulosic cell wall polysaccharides during the growth of carrot cells in suspension cultures. Planta 158, 166-174.

Axelos, M., Peaud-Lenoel, C. (1978): Glycosyltransfers from UDP-sugars to lipids of plant membranes: Identification and specifity of the transferases. Biochimie 60, 35-44.

Baguley, B.C., Römmele, G., Gruner, J., Wehrli, W. (1979): Papulacandin B: An inhibitor of glucan synthesis in yeast spheroplasts. Eur. J. Biochem. 97, 345-351.

Baker, D.B., Ray, P.M. (1965): Direct and indirect effects of auxin on cell wall synthesis in oat coleoptile tissue. Plant Physiol. 40, 345-352.

Barbar, G.A. (1982): Observations on the enzymatic synthesis of a ß-1,4-glucan by a soluble preparation from mung bean (Phaseolus aureus). Arch. Biochem. Biophys. 215, 253-259.

Barber, G.A., Elbein, A.D., Hassid, W.Z. (1964): The synthesis of cellulose by enzyme systems from higher plants. J. Biol. Chem. 239, 4056-4061.

Baydoun, E. A.-H., Brett, C.T. (1984): The effect of pH on the binding of calcium to pea epicotyl cell walls and its implications for the control of cell extension. J. Exp. Botany 35, 1820-1831.

Behnke, O., Tranum-Jensen, J., Van Deurs, B. (1984): Filipin as a cholesterol probe. I. Morphology of filipin-cholesterol interaction in lipid model systems. Eur. J. Cell Biol. 35, 189-199.

Benziman, M., Haigler, C.H., Brown, R.M., White, A.R., Cooper, K.M. (1980): Cellulose biogenese: Polymerization and crystallization are coupled processes in Acetobacter xylinum Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 6678-6682.

Bisswanger, H. (1979): Theorie und Methoden der Enzymkinetik. Verlag Chemie, Weinheim.

Blaschek, W., Haaß, D., Koehler, H., Franz, G. (1981): Cell wall regeneration by Nicotiana tabacum protoplasts: Chemical and biological aspects. In: Cell Walls 81, Proceedings of the Second Cell Wall Meeting held in Göttingen, April. 1981. Robinson, D.G., Quader, H. (Eds.), S. 109-118.

Blaschek, W., Koehler, H., Semler, U., Franz, G. (1982): Molecular weight distribution of cellulose in primary cell walls. Investigations with regenerating protoplasts suspension cultured cells and mesohyll of tobaco. Planta 154, 550-555.

Blaschek, W., Haaß, D., Koehler, H., Semler, U., Franz, G. (1983): Demonstration of a ß-1,4-primer glucan in cellulose-like glucan synthesized in vitro. Z. Pflanzenphysiol. 111, 357-364.

Boller, T., Kende, H. (1979): Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. Plant Physiol. 63, 1123-1132.

Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Brett, C.T. (1978): Synthesis of ß-1,3-glucan from extracellular uridine diphosphate glucose as a wound response in suspension-cultured soybean cells. Plant Pnysiol. 62, 337-382.

Brett, C.T. (1981): Polysaccharide synthesis from GDP-glucose in pea epicotyl slices. J. Exp. Botany, 32, 1067-1077.

Brett, C.T. (1982): Techniques in the life sciences. Techniques in carbohydrate metabolism. Biochem. B307, 1-11.

Brett, C.T., Northcote, D.H. (1975): The formation of oligoglucans linked to lipid during synthesis of ß-glucan by characterized membrane fractions isolated from peas. Biochem. J. 148, 107-117.

Brown, R.G., Kimmins, W.C. (1979): Linkage analysis of hydroxyproline poor - glycoprotein from Phaseolus vulgaris. Plant Physiol. 63, 557-561.

Brown, R.M., Montezinos, D. (1976): Cellulose microfibrils: Visualization of biosynthetic and orienting complexes in association with the plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 143-147.

Brown, R.M., Franke, W.W., Kleinig, H., Falk, H., Sitte, P. (1969): Cellulosic wall component produced by the Golgi apparatus of Pleurochrysis scherffelii. Science 166, 894.

Brummond, D.O., Gibbons, A.P. (1964): The enzymatic synthesis of cellulose by the higher plant Lupinus albus. Biochem. Biphys. Res. Commun. 17, 156.

Burgess, J. (1983): Wall regeneration around isolated protoplasts. International Review of Cytology, Supplement 16. In: Plant Protoplasts. Giles, K.L. (Ed.), Academic Press, New York, London.

Burgess, J., Linstead, P.J. (1977): Coumarin inhibition of microfibril formation at the surface of cultured protoplasts. Planta 133, 267-273.

Callaghan, T., Benziman, H. (1984): High rates of in vitro synthesis of 1,4-ß-D-glucan in cell-free preparations from Phaseolus aureus. Nature 311, 165-167.

Callaghan, T., Benziman, H. (1985): Corrigendum: High rates of in vitro synthesis of 1,4-ß-D-glucan in cell-free preparations from Phaseolus aureus. Nature 314, 383.

Carpita, N.C., Delmer, D.P. (1980): Protection of cellulose synthesis in detached cotton fibers by polyethylen glycol. Plant Physiol. 66, 911-916.

Carpita, N.C., Delmer, D.P. (1981): Concentration and metabolic turnover of UDP-glucose in developing cotton fibers. J. Biol. Chem. 256, 308-315.

Cassone, A., Mason, R.E., Kerridge, D. (1981): Lysis of growing yeast-form cells of Candida albicans by Echinocandin: A cytological study. Sabouraudia 19, 97-110.

Catt, J.W. (1981): Cell wall mutants from higher plants. A new method using cell wall enzyms. Phytochem. 20, 2487-2488.

Cleland, R.E. (1973): Auxin-induced hydrogen ion excretion from Avena coleoptiles. Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 3092-3093.

Colowick, S.P., Kaplan, N.O. (1984): Enzyme Purification and Related Techniques, Part C. W.B. Jakoby (Ed.). Academic Press Inc., New York, London. S. 305-347.

Cooper, K.M. (1982): Callose-deposit formation in radish root hairs. In: Cellulose and Other Natural Polymer Systems. R. M. Brown Jr. (Ed.), Plenum Press, New York, S. 167 - 184.

Cross, W., Briggs, W.R. (1976): An evaluation of markers for plasma membrane fractions from Zea mays. Carnegie Inst. Washington Year Book 75/76, S. 379-383.

Datema, R., Schwarz, R.T., Rivas, L.A., Pont-Lezica, R. (1983): Inhibition of ß-1,4-glucan biosynthesis by deoxyglucose. The effect on the glucosylation of lipid intermediates. Plant Physiol. 71, 76-81.

Davies, H.M., Delmer, D.P. (1982): Protein glucosylation in higher plants: Recent developments. In: Cellulose and Other Natural Polymer Systems. R.M. Brown Jr. (Ed.). Plenum Press, New York. S. 363-377.

Delmer, D.P. (1977): The biosynthesis of cellulose and other plant cell wall polysaccharides. In: Recent Advances in Phytochemistry. Plenum Publishing Corp., New York. S. 45-77.

Delmer, D.P. (1981): The effect of alterations in transmembrane electrical potential on the biosynthesis of cellulose and ß-1,3-glucan. In: Cell Walls 81 (Proceedings of the Second Cell Wall Meeting held in Göttingen, April 8th - 11th. D.G. Robinson/H. Quader (Eds.). S. 94-98.

Delmer, D.P. (1983): Biosynthesis of cellulose. In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 41. Academic Press, New York, London. S. 105-153.

Delmer, D.P., Heininger, U., Kulow, K. (1977): UDP-Glucose: Glucan synthetase in developing cotton fibers. 1. Kinetic and physiological properties. Plant Physiol. 59, 713-718.

Dey, P.M., Brinson, K. (1984): Plant cell walls. In: Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry, Vol. 42, 265-382.

Dixon, R.A., Webb, E.C. (1979): Enzymes. 3rd Edition, Longman, London.

Eda, S., Akiyama, Y., Kato, K., Ishizu, A., Nakano, J. (1985): A galactoglucomannan from cell walls of suspension cultured tobacco (Nicotiana tabacum) cells. Carbohydrate Res. 137, 173-181.

Eiberberger, L.L., Ventola, C.L., Wasserman, B.P. (1985): Solubilization of a digitonin-stable glucansynthase from red beet root. Plant Sci. Lett. 37, 195-198.

Elbein, A.D. (1969): Biosynthesis of a cell wall glucomannan in mung bean seedlings. J. Biol. Chem. 244, 1608-1616.

Elbein, A.D., Hassid, W.Z. (1966): The enzymatic synthesis of a glucomannan. Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 311-318.

Feingold, D.S., Neufeld, E.F., Hassid, W.Z. (1958): Synthesis of ß-(1-3) linked glucan by extract of Phaseolus aureus seedlings. J. Biol. Chem. 233, 783-788.

Fèvre, M. (1979): Digitonin solubilization and protease stimulation of ß-glucan synthetases of Saprolegnia. Z. Pflanzenphys. 95, 129-140.

Fèvre, M. (1983): Nucleotide effects on glucan synthesis activities of particulate enzymes from Saprolegnia. Planta 159, 130-135.

Fèvre, M., Rougier, M. (1981): ß1-3 and ß1-4 glucan synthesis by membrane fractions from fungus Saprolegnia. Planta 151, 232-241.

Flowers, H.M., Batra, K.K., Kemp, J., Hassid, W.Z. (1969): Biosynthesis of cellulose in vitro from guanosine diphosphate D-glucose with enzymic preparations from Phaseolus aureus and Lupinus albus. Biol. Chem. 244, 4969.

Franz, G. (1973): Biosynthesis of salep mannan. Phytochem. 12, 2369.

Franz, G., Meier, H. (1969): Biosynthesis of cellulose in growing cotton hairs. Phytochem. 8, 579.

Fry, S.C. (1982): Isodityrosine, a new cross-linking aminoacid from plant cell wall glycoprotein. Biochem. J. 204, 449-455.

Fukuda, H., Komamine, A. (1980): Establishment of an experimental system for the study of tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll of Zinnia elegans. Plant Physiol. 65, 57-60.

Fukuda, H., Komamine, A. (1982): Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of Zinnia elegans. Planta 155, 423-430.

Galbraith, D. (1981): Microfluorimetric quantitation of cellulose biosynthesis by plant protoplasts using Calcofluor white. Physiol. Plant. 53, 111-116.

Galbraith, D.W., Shields, B.A. (1982): The effects of inhibitors of cell wall synthesis on tobacco protoplast development. Physiol. Plant 55, 25-30.

Gankema, H.S., Laanen, E., Groen, A.K., Tager, J.M. (1981): Characterization of isolated rat-liver cells made permeable with Filipin. Eur. J. Biochem. 119, 409-414.

Garcia, R.E., Mudd, J.B. (1980): Inhibition of steryl glycoside biosynthesis by acyl coenzyme A and by digitonin. Plant Physiol. 66, 257-260.

Giddings Jr., T.H., Brower, D.L., Staehelin, L.A. (1980): Visualization of particle complexes in the plasma membrane of Micrasterias denticulata associated with the formation of cellulose fibrils in primary and secondary cell walls. J. Cell Biol 84, 327-339.

Girard, V., Fèvre, M. (1984): ß-1,4- and ß-1,3-glucan synthases are associated with the plasma membrane of the fungus Saprolegnia. Planta 160, 400-406.

Glaser, L. (1958): The synthesis of cellulose in cell-free extracts of Acetobacter xylinum. J. Biol. Chem. 232, 627.

Glund, K., Tewes, A., Abel, S., Leinhos, V., Walter, R., Reinbothe, H. (1984): Vacuoles from cell suspension cultures of tomato (Lycopersicon esculentum). Isolation and characterization. Z. Pflanzenphys. 113, 151-161.

Goldberg, R., Prat, R. (1982): Involvement of cell wall characteristics in growth processes along the mung bean hypocotyl. Plant Cell Physiol. 23, 1145-1154.

Gross, J. (1982): Oxalate-enhanced active calcium uptake in membrane fractions from Zucchini squash. In: Plasmalemma and Tonoplast. Their Functions in the Plant Cell. D. Marmé, E. Marrè, R. Hertel (Eds.), Elsevier Biomedical Press B-V., Amsterdam. S. 369-376.

Grossmann, K., Rademacher, W., Jung, J. (1982): Plant cell suspension cultures as model system for investigating growth regulating compounds. Plant Cell Reports 1, 281-284.

Grossmann, K., Rademacher, W., Jung, J. (1983): Effects of NDA, a new plant growth retardant, on cell culture growth of Zea mays L. J. Plant Growth Regul. 2, 19-29.

Grossmann, K., Weiler, E.W., Jung, J. (1985): Effects of different sterols on the inhibition of cell culture growth caused by the growth retardant tetcyclacis. Planta 164, 370-375.

Haaß, D., Blaschek, W., Koehler, H., Franz, G. (1981): In vitro formation of cell wall polysaccharides with membrane fractions from tobacco protoplasts or callus. In: Cell Walls 81. Proceedings of the Second Cell Wall Meeting held in Göttingen, April, 1981. D.G. Robinson, H. Quader (Eds.), S. 119-127.

Hager, A., Menzel, H., Krauss, A. (1971): Experiments and hypothesis concerning the primary action of auxin in elongation growth. Planta 100, 47-75.

Haigler, C.H., Brown, R.M., Benziman, M. (1980): Calcolfuor white ST alters the in vivo assembly of cellulose microfibrils. Science 210, 903-906.

Hakomori, S. (1964): A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxid. J. Biochem. 55, 205-208.

Hara, M., Umetsu, N., Miyamoto, C., Tamari, K. (1973): Inhibiton of the synthesis of plant cell wall materials especially cellulose biosynthesis by coumarin. Plant Cell Physiol. 14, 11-28.

Haselbeck, A., Tanner, W. (1982): A possible role of polyprenyl phosphates in membrane transport of cell wall precursors. In: Plasmalemma and Tonoplast: Their Funktions in the Plant Cell. D. Marmé, E. Marrè, R. Hertel (Eds.), Elsevier Biomedical Press B.V., Amsterdam. S. 347-352.

Hayashi, T., Matsuda, K. (1981): Biosynthesis of xyloglucan in suspension-cultured soybean cells. Evidence that the enzyme system of xyloglucan synthesis does not contain ß-1,4-glucan 4-ß-D glucosyltransferase activity. Plant a. Cell Physiol. 22 (8), 1571-1584.

Hayashi, T., Wong, Y.S., MacLachlan, G. (1984): Pea xyloglucan and cellulose. II. Hydrolysis by pea endo-1,4-ß-glucanases. Plant Physiol. 75, 605-610.

Heininger, U. (1981): ß-1,3-glucan synthesis in potato tubers. In: Cell Walls 81. Proceedings of the Second Cell Wall Meeting held in Göttingen, April 1981. D.G. Robinson, H. Quader (Eds.). S. 85-93.

Heininger, U. (1983): UDP-glucose: 1,3-ß glucansynthase in potato tubers: Solubilization and activation by lipids. Plant Sci. Lett. 32, 35-41.

Heller, J.S., Villemez, C.L. (1972): Solubilization of a mannose polymerizing enzyme from Phaseolus aureus. Biochem J. 128, 243-252.

Hendriks, T. (1978): The distribution of glucan synthetase in maize coleoptiles: A comparison with K-ATPase. Plant Sci. Lett. 11, 261-274.

Henry, R.J., Stone, B.A. (1982a): Factors influencing ß-glucan synthesis by particulate enzymes from suspension-cultured Lolium multiflorum endosperm cells. Plant Physiol. 69, 632-636.

Henry, R.J., Stone, B.A. (1982b): Solubilization of ß-glucan synthases from the membranes of cultured rye grass endosperm cells. Biochem. J. 203, 629-636.

Henry, R.J., Schibeci, A., Stone, B.A. (1983): Localization of ß-glucan synthases on the membranes of cultured Lolium multiflorum (rye grass) endosperm cells. Biochem. J. 209, 627-633.

Herth, W. (1980): Calcofluor white and Congo Red inhibit chitin microfibril assembly of Poterioochromonas: Evidence for a gap between polymerization and microfibril formation. J. Cell Biol. 87, 442-450.

Herth, W. (1983): Arrays of plasma-membrane "rosettes" involved in cellulose microfibril formation of Spirogyra. Planta 159, 347-356.

Hinderer, W., Petersen, M., Seitz, H.U. (1984): Inhibition of flavonoid biosynthesis by gibberellic acid in cell suspension cultures of Daucus carota L. Planta 160, 544-549.

Hodges, T.K., Leonard, R.T. (1974): Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. In: Methods of Enzymology. C.S.P. Colowick, N.O. Kaplan (Eds.), Vol. 32B, Academic Press, New York. S. 392-406.

Hogetsu, T., Shibaoka, H., Shimokoriyama, M. (1974): Involvement of cellulose synthesis in actions of gibberellin and kinetin on cell expansion. 2.6.Dichlorobenzonitrile as a new cellulose-synthesis inhibitor. Plant Cell Physiol. 15, 389-393.

Hopp, H.E., Romero, P.A., Daleo, G.R., Pont Lezica, R. (1978): Synthesis of cellulose precursors. The involvement of lipid-linked sugars. Europ. J. Biochem. 84, 561-571.

Hopp, W., Hinderer, W., Petersen, M., Seitz, H.U. (1985): Anthocyanin-containing vacuoles isolated from protoplasts of Daucus carota cell cultures. In: The Physiological Properties of Plant Protoplasts. P.E. Pilet (Ed.), Springer Verlag, Berlin, Heidelberg. S. 122-132.

Huber, D.J., Nevins, D.J. (1981): Wall-protein antibodies as inhibitors of growth and autolytic reactions of isolated cell wall. Physiol. Plant. 53, 533-539.

Huber, D.J., Nevins, D.J. (1982): Exoglucanases from Zea mays L. seedlings: Their role in ß-D-glucan hydrolysis and their potential role in extension growth. Planta 155, 467-472.

Ingold, E. (1982): Isolierung und Charakterisierung von Glucansynthetase-Aktivitäten in Membranvesikeln aus pflanzlichen Zellkulturen (Daucus carota L). Diplomarbeit, Tübingen.

Inouhe, M., Yamamoto, R., Masuda, Y. (1984): Auxin-induced changes in the molecular weight distribution of cell wall xyloglucans in Avena coleoptiles. Plant Cell Physiol. 25, 1341-1351.

Jansson, P., Lennart, K., Liedgren, H., Lindberg, B., Lönngren, J. (1976): A practical guide to the methylation analysis of carbohydrates. Chem. commun. (Stockholm Univ.) 8.

Jones, R.L. (1982): Gibberellin control of cell elongation. In: Plant Growth Substances. Wareing, P.F. (Ed.), Academic Press, New York. S. 121-130.

Kato, Y., Ito, S., Iki, K., Matsuda, K. (1982): Xyloglucan and ß-D-glucan in cell walls of rice seedlings. Plant Cell Physiol. 23, 351-364.

Kauss, H., Köhle, H., Jeblick, W. (1983): Proteolytic activation and stimulation by $Ca^{2+}$ of glucan synthase from soybean cells. FEBS 158, 84-88.

Klein, A.S., Montezinos, D., Delmer, D.P. (1981): Cellulose and 1,3 glucan synthesis during the early stages of wall regeneration in soybean protoplasts. Planta 152, 105-114.

Koblitz, H., Hagen, F. (1962): Vergleichende Untersuchungen über das Wachstum isolierter Karottengewebe auf halbsynthetischen Substraten und auf einem vollsynthetischen Medium. Flora 152, 447-457.

Köhle, H., Jeblick, W., Poten, F., Blaschek, W., Kauss, H. (1985): Chitosan-elicited callose synthesis in soybean cells as a $Ca^{2+}$-dependent process. Plant Physiol. 77, 544-551.

Kroh, M., Knuiman, B. (1982): Ultrastructure of cell wall and plugs of tobacco pollen tubes after chemical extraction of polysaccharides. Planta 154, 241-250.

Labavitch, J.M., Ray, P.M. (1974): Relationship between promotion of xyloglucan metabolism and induction of elongation by IAA. Plant Physiol. 54, 499-502.

Lamport, D.T.A. (1980): Structure and function of plant glycoproteins. In: The Biochemistry of Plants, Vol. 3. Academic Press, New York. S. 501-541.

Langebartels, C., Seitz, U., Seitz, H.U. (1981): ß-glucan synthetase activities in regenerating protoplasts from carrot suspension cultures. Pl. Sci. Lett. 22, 327-335.

Larsen, G.L., Brummond, D.O. (1974): ß-(1,4)-D-glucan synthesis from UDP-($^{14}C$)-D-glucose by a solubilized enzyme from Lupinus albus. Phytochemistry, 13, 361-365.

Larsson, C., Kjellbom, P., Widell, S., Lundborg, T. (1984): Sidedness of plant plasma membrane vesicles purified by partitioning in aqueous two-phase systems. FEBS 171, 271-276.

Lavintman, N., Tandecarz, J., Carceller, M., Mendiara, S., Cardini, C.E. (1974): Role of uridine diphosphate glucose in the biosynthesis of starch. Mechanism of formation and enlargement of a glucoproteic acceptor. Eur. J. Biochem. 50, 145-155.

Lehninger, A.L. (1975): Biochemistry. Second Edition. The molecular basis of cell structure and function. Worth Publishers, Inc. New York.

Leigh, R.A., Walker, R.R. (1980): ATPase and acid phosphatase activities associated with vacuoles isolated from storage roots of red beet. Planta 150, 222-229.

Lin, T.-J., Morales, M.F. (1977): Application of a one step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: The actomyosin ATPase system. Anal. Biochem. 77, 10-17.

Liu, T.-Y., Hassid, W.Z. (1970): Solubilization and partial purification of cellulose synthetase from Phaseolus aureus. J. Biol. Chem. 245, 1922-1925.

MacLachlan, G. (1982): Does β-glucan synthesis need a primer? In: Cellulose and other Natural Polymer Systems. R.M. Brown Jr. (Ed.), Plenum Press, New York, S. 327-337.

MacLachlan, G., Dürr, M., Raymond, Y. (1979): Towards the isolation of effective membrane-bound β-glucan synthetase complexes. In: Plant Organelles. Methodological Surveys in Biochemistry. Reid, E. (Ed.), Ellis Horwood, New York. S. 146-157.

Marx-Figini, M. (1962): Die viskosimetrische Molekulargewichtsbestimmung von Cellulosen und Cellulosenitraten unter Standardbedingungen. Macromol. Chem. 54, 107-118.

Masuda, H., Ozeki, Y., Amino, S., Komamine, A. (1984): Changes in cell wall polysaccharides during elongation in a 2,4-D free medium in a carrot suspension culture. Physiol. Plant. 62, 65-72.

McNeil, M., Darvill, A.G., Fry, S.C., Albersheim, P. (1984): Structure and function of the primary cell walls of plants. Ann. Rev. Biochem. 53, 625-663.

Metha, R.J., Nash, C.H., Grappel, S.F., Actor, P. (1982): Aculeacin A resistant mutants of Candida albicans. J. Antibiotics. XXXV (6), 707.

Meyer, Y., Herth, W. (1978): Chemical inhibition of cell wall formation and cytokinesis but not of nuclear division, in protoplasts of Nicotiana tabacum L. cultivated in vitro. Planta 142, 253-262.

Montezinos, D., Brown, R.M: (1979): Cell wall biogenesis in Oocystis: Experimental alteration of microfibril assembly and orientation. Cytobios. 23, 119-139.

Montezinos, D., Delmer, D.P. (1980): Characterization of inhibitors of cellulose synthesis in cotton fibers. Planta 148, 305-311.

Mueller, S.C., Brown Jr., R.M. (1980): Evidence for an intramembrane component associated with a cellulose microfibril synthesizing complex in higher plants. J. Cell Biol. 84, 315-326.

Mueller, S.C., MacLachlan, G.A. (1982): Radioautographic visualization of β-glucans formed by pea membranes from UDPG. Can. J. Bot. 61, 1266-1275.

Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15, 473-496.

Nagahashi, G., Baker, A. (1984): ß-glucosidase activity in corn roots. Problems in subcellulalr fractionation. Plant Physiol. 76, 861-864.

Nishitani, K., Masuda, Y. (1981): Auxin induced changes in the cell wall structure: Changes in the sugar compositions, intrinsic viscosity and molecular weight distribution of matrix polysaccharides of the epicotyl cell wall of Vigna angularis. Physiol. Plant. 52, 482-494.

Nishitani, K., Masuda, Y. (1982): Roles of auxin and gibberellic acid in growth and maturation of epicotyls of Vigna angularis cell wall changes. Physiol. Plant. 56, 38-46.

Nishitani, K., Masuda, Y. (1982/83): Acid pH-induced structural changes in cell wall xyloglucans in Vigna angularis epicotyl segments. Plant Sci. Lett. 28, 87-94.

Noé, W., Seitz, H.U. (1982): Induction of de novo synthesis of phenylalanine ammonialyase by L-α-aminooxy-ß-phenylpropionic acid in suspension cultures of Daucus carota L. Planta 154, 454-458.

Northcote, D.H. (1977): The synthesis and assembly of plant cell walls: Possible control mechanisms. In: Cell Surface Reviews, Vol. 4. G. Poste, G.L. Nicolson (Eds.). Elsevier North Holland Biochemical Press. S. 717-739.

Odzuck, W., Kauss, H. (1972): Biosynthesis of pure araban and xylan. Phytochem. 11, 2489.

Orci, L., Montesano, R., Meda, P., Malaisselagae, F., Brown, D., Perrelet, A., Vassalli, P. (1981): Heterogeneous distribution of Filipin-cholesterol complexes across the cisternae of the Golgi apparatus. Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 293-297.

Ordin, L., Hall, M.A. (1968): Cellulose synthesis in higher plants from UDP-glucose. Plant Physiol. 43, 473.

Orlean, P.A.B. (1982): (1,3)-ß-D-glucan synthase from budding and filamentous cultures of the dimorphic fungus Candida albicans. Eur. J. Biochem. 127, 397-403.

Panayotatos, N., Villemez, C.L. (1973): The formation of a ß-(1,4)-D-Galactan chain catalyzed by a Phaseolus aureus enzyme. Biochem. J. 133, 263.

Pérez, P., Garcia-Acha, I., Durán, A. (1983): Effect of Papulacandin B on the cell wall and growth of Geotrichum lactis. J. Gen. Microbiol. 129, 245-250.

Phillips, L.R., Fraser, B.A. (1981): Methylation of carbohydrates with dimsyl potassium in dimethylsulfoxide. Carbohydrate Res. 90, 149-152.

Pink Floyed (1979): The Wall. Emi Electrola GmbH, Germany.

Polya, G.M., Schibeci, A., Micucci, V. (1984): Phosphorylation of membrane proteins from cultured Lolium multiflorum (Rye grass) endosperm cells. Plant Sci. Lett. 36, 51-57.

Pont Lezica, R., Romero, P.A., Hopp, H.E. (1978): Glucosylation of membrane-bound proteins by lipid-linked glucose. Planta 140, 177-183.

Prat, R., Gueissaz, M.-B., Goldberg, R. (1984): Effects of $Ca^{2+}$ and $Mg^{2+}$ on elongation and $H^+$ secretion of Vigna radiata hypocotyl sections. Plant Cell Physiol. 25, 1459-1469.

Prehm, P., Scheid, A. (1978): Sensitive method for the analysis of carbohydrates by gaschromatography of $^3H$-labelled alditol acetates. J. Chrom. 166, 461-467.

Preston, R. D. (1982): The case for multinet growth in growing walls of plant cells. Planta 155, 356-363.

Quader, H. (1981): Interruption of cellulose microfibril crystallization. Naturwissenschaften 68, 428-429.

Quader, H., Robinson, D.G. (1979): Structure, synthesis and orientation of microfibrils. VI. The role of ions in microfibril deposition in Oocystis solitaria. Eur. J. Cell Biol. 20, 51-56.

Quail, P.H. (1979): Plant cell fractionation. Ann. Rev. Plant Physiol. 30, 425-484.

Quantin, E., Hartmann-Bouillon, M.A., Schuber, F., Benveniste, P. (1980): Latency of uridine diphosphate glucose-sterol-ß-D-glucosyltransferase, a plasma membrane-bound enzyme of etiolated maize coleoptiles. Plant Sci. Lett. 17, 193-199.

Rademacher, W., Jung, J., Hildebrandt, E., Graebe, J.E. (1983): Zum Wirkungsmechanismus einiger neuentwickelter Wachstumsretardantien. In: Hohenheimer Arbeiten: Regulation des Phytohormongehaltes und seine Beeinflussung durch synth. Wachstumsregulatoren. F. Bangerth (Ed.). Ulmer-Stuttgart.

Ray, P.M. (1973a): Regulation of ß-glucan synthetase activity by auxin in pea stem tissue. I. Kinetic aspects. Plant Physiol. 51, 601-608.

Ray, P.M. (1973b): Regulation of ß-glucan synthetase activity by auxin in pea stem tissue. II: Metabolic requirements. Plant Physiol. 51, 609-614.

Ray, P.M. (1979): Maize coleoptile cellular membranes bearing different types of glucan synthetase activity. In: Plant Organelles. E. Reid (Ed.), Ellis Horwood, New York. S. 135-146.

Ray, P.M. (1980): Cooperative action of ß-glucan synthetase and UDP-xylose xylosyl transferase of Golgi membranes in the synthesis of xyloglucan-like polysaccharide. Biochim. Biophys. Acta 629, 431-444.

Ray, P.M., Shininger, J.L., Ray, M.M. (1969): Isolation of ß-glucan synthetase particles from plant cells and identification with golgi membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. 64, 605-612.

Raymond, Y., Fincher, G.B., MacLachlan, G.A. (1978): Tissue slice and particulate ß-glucan synthetase activities from Pisum-epicotyls. Plant Physiol. 61, 938-942.

Reese, E.T. (1977): Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. In: Recent Advances in Phytochemistry. Vol. 11, 311-367.

Reiss, H.D., Schnepf, E., Herth, W. (1984): The plasma membrane of the Funaria caulonema tip cell: morphology and distribution of particle rosettes, and the kinetics of cellulose synthesis. Planta 160, 428-435.

Roberts, E., Seagull, R.W., Haigler, C.H., Brown, R.M. (1982): Alteration of cellulose microfibril formation in eukaryotic cells - Calcofluor white interferes with microfibril assembly and orientation in Oocystis apiculata. Protoplasma 113, 1-10.

Robinson, D.G. (1985): Plant Membranes. Endo- and Plasma Membranes of Plant Cells. A Wiley-Interscience Publication. John Wiley & Sons. New York.

Robinson, D.G., Quader, H. (1981): Towards cellulose synthesis in vitro from plant extracts. J. theor. Biol. 92, 483-495.

Robinson, D.G., Quader, H. (1982): The microtubule-microfibril syndrome. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. C.W. Lloyd (Ed.). Academic Press, London, New York. S. 109-126.

Robinson, D.G., Glas, R. (1983): The glucan synthases from suspension cultured sugar cane cells. J. Exp. Botany 34. 668-675.

Robinson, D.G., Eberle, M., Hafemann, C., Wienecke, K., Graebe, J.E. (1982): $Mg^{2+}$-shifting of plasma membrane associated glucan synthetase activity. Z. Pflanzenphysiol. 105, 323-330.

Robyt, J.F., Martin, D.J. (1983): Mechanism of synthesis of D-glucans by D-glucosyltransferases from Streptococcus mutans 6715. Carbohydr. Res. 113, 301.

Römmele, G., Traxler, P., Wehrli, W. (1983): Papulacandins - The relationship between chemical structure and effect on glucan synthesis in yeast. J. Antibiotics, Vol. XXXVI, No. 11, 1539.

Sasaki, K. (1983): Changes in neutral sugar composition of cell wall polysaccharides during redifferentiation of cultured carrot cells and during maturation of soybean seeds. Plant Cell Physiol. 24, 811-821.

Satoh, S., Takahara, M., Matsuda, K. (1976): Inhibition of the synthesis of microbial cellulose by coumarin. Plant a. Cell Physiol. 17, 1077-1080.

Saunders, M.J., Hepler, P.K. (1983): Calcium antagonists and calmodulin inhibitors block cytokinin-induced bud formation in Funaria. Devel. Biol. 99, 41-49.

Sawistowska-Schröder, E.T., Kerridge, D., Perry, H. (1984): Echinocandin inhibition of 1,3-ß-glucan synthase from Candida albicans. FEBS Lett. 173, 134-183.

Schleicher, M., Iverson, D.B., Van Eldik, L.J., Watterson, D.M. (1982): Calmodulin. In: The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. Lloyd, C.W. (Ed.). Academic Press, London, New York. S. 85-106.

Schwarz, R.T., Datema, R. (1980): Inhibitors of protein glycosylation. TIBS 65-67.

Schwer, B. (1984): Biosynthese von Zellwand-Polysacchariden bei Zellkulturen von Gossypium hirsutum L. Diplomarbeit, Tübingen.

Seitz, H.U., Seitz, U., Alfermann, W. (1985): Pflanzliche Gewebekultur. Ein Praktikum. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.

Shannon, P.R.M., Flood, A.E., Wain, R.L. (1984): Auxin-induced cell expansion of potato tuber and chicory root: Role of hydroxyproline synthesis. Physiol. Plant. 62, 201-208.

Shematek, E.M., Braat, J.A., Cabib, E. (1980a): Biosynthesis of the yeast cell wall. I. Preparation and properties of ß-(1,3) glucan synthetase. J. Biol. Chem. 255, 888-894.

Shematek, E.M., Braat, J.A., Cabib, E. (1980b): Biosynthesis of the yeast cell wall. II. Regulation of ß-1,3 glucan synthetase by ATP and GTP. J. Biol. Chem. 255, 895-902.

Shore, G., MacLachlan, G.A. (1975): The site of cellulose synthesis. Hormone treatment alters the intracellular location of alkali-insoluble ß-1,4-glucan synthetase activities. J. Cell Biol. 64, 557-571.

Smith, E., Roberts, K., Hutchings, A., Galfre, G. (1984): Monoclonal antibodies to the major structural glycoprotein of the Chlamydomonas cell wall. Planta 161, 330-338.

Stafford, L.E., Brummond, D.O. (1970): ß-(1-4)-D-glucan synthesis from UDP-($^{14}$C)-glucose by particulate and solubilized enzyme preparations from Lupinus albus. Phytochem. 9, 253-258.

Stone, B.A., Evans, N.A., Bonig, I., Clarke, A.E. (1984): The application of siro fluor, a chemically defjned fluorochrome from aniline blue for the histochemical detection of callose. Protoplasma 122, 191-195.

Takata, M., Pickard, W.F., Lettvin, J.Y., Moore, J.W. (1966): Ionic conductance changes in lobster axon membrane when lanthanum is substituted for calcium. J. Gen. Physiol. 50, 461-471.

Takeuchi, Y., Komamine, A. (1981): Glucans in the cell walls regenerated from Vinca rosea protoplasts. Plant Cell Physiol. 22, 1585-1594.

Taiz, L. (1984): Plant cell expansion: Regulation of cell wall mechanical properties. Ann. Review Plant Physiol. 35, 585-657.

Tandecarz, J., Lavintman, N., Cardini, C.E. (1975): Biosynthesis of starch. Formation of a glucoproteic acceptor by a potato nonsedimentable preparation. Biochim. Biophys. Acta 345-355.

Terry, M.E., Jones, R.L., Bonner, B.A. (1981): Soluble cell wall polysaccharides released by pea stems by centrifugation. I. Effect of auxin. Plant Physiol. 68, 531-538.

Townsend, C.O. (1897): Der Einfluß des Zellkernes auf die Bildung der Zellhaut. Jahrbuch Wiss. Bot. 30, 484-510.

Traber, R., Keller-Juslin, C., Loosli, H.-R., Kuhn, M., v. Wartburg, A. (1979): Cyclopeptid-Antibiotika aus Aspergillus-Arten. Struktur der Echinocandine C und D. In: Helvetica Chimica acta, Vol. 62, Fasciculus quartus. S. 1252-1267.

Tsai, C.M., Hassid, W.Z. (1971): Solubilization and separation of uridine diphospho-D-glucose: ß-(1,4) glucan and uridine diphospho-D-glucose: ß-(1,3) glucan glucosyltransferases from coleoptiles of Avena sativa. Plant Physiol. 47, 740-744.

Updegraff, D.M. (1969): Semimicro determination of cellulose in biological materials. Anal. Biochem. 32, 420-424.

Van der Woude, W.J., Lembi, C.A., Morré, D.J., Kindinger, J.I., Ordin, L. (1974): ß-glucan synthetases of plasma membrane and Golgi-apparatus from onion stem. Plant Physiol. 54, 333-340.

Villemez, C.L. (1971): Rate studies of polysaccharide biosynthesis from guanosine diphosphate α-D-glucose and guanosine diphosphate α-D-mannose. Biochem. J. 121, 151-157.

Villemez, C.L., Lin, T.Y., Hassid, W.Z. (1965): Biosynthesis of the polygalacturonic acid chain of pectin by a particulate enzyme preparation from Phaseolus aureus seedlings. Proc. Natl. Acad. Sci. 54, 1626.

Walton, J.D., Ray, P.M. (1982): Auxin controls Golgi-localized glucan synthetase activity in the maize mesocotyl. Planta 156, 309-313.

Wienecke, K., Glas, R., Robinson, D.G. (1982): Organelles involved in the synthesis and transport of hydroxyproline-containing glycoproteins in carrot root discs. Planta 155, 58-63.

Yamamoto, R., Masuda, Y. (1984): Galactose inhibition of auxin-induced cell elongation in oat coleoptile segments. Physiol. Plant. 61, 321-3266.

Zelcer, A., Galun, E. (1980): Culture of newly isolated tobacco protoplasts: Cell division and precursor incorporation following a transient exposure to Coumarin. Plant Sci. Lett. 18, 185-190.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. H. U. Seitz für die Unterstützung und Hilfe während der Durchführung dieser Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für interessante Diskussionen, Anregungen, die gute Zusammenarbeit sowie für das gute Arbeitsklima.

Bei Herrn H.-P. Mock bedanke ich mich für die Hilfe bei der Messung von Leitenzymen.

Auch vielen weiteren Kollegen und Angestellten des Instituts, die mich bei der Durchführung der Arbeit durch Diskussionen und Hilfen in methodischen und technischen Fragen unterstützten, sei an dieser Stelle gedankt.

Für die Durchführung der Methylierungsanalyse bedanke ich mich bei Dr. W. Blaschek aus Regensburg.

Bedanken möchte ich mich bei folgenden Personen und Firmen, die mir Präparate zur Verfügung stellten, die teilweise nicht käuflich sind: Dr. J. E. Grady, Upjohn Company, Kalamazoo, USA; Prof. Dr. J. Nüesch, Ciba-Geigy, Basel, Schweiz; Dr. M. Dreyfuss, Sandoz Ltd., Basel, Schweiz; Dr. J. Konze, Bayer AG, Leverkusen; Dr. K. Grossmann, BASF, Limburgerhof, Dr. E. T. Reese, Food Science Laboratory, US Army Research and Development Command, Natick, USA; Prof. Dr. B. A. Stone, Department of Biochemistry, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australia.

Alle denen gilt mein Dank, die durch die Betreuung meiner Tochter eine große Hilfe beim Zusammenschreiben dieser Arbeit waren (besonders meiner Mutter und Frau A. Thaler).

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Frau, die abends und an Wochenenden das Manuskript tippte und der Arbeit ihre endgültige Form verlieh.

# L e b e n s l a u f

Edgar Ingold, geboren am 21. August 1955 in Freiburg als Sohn des Chemie-Facharbeiters Max Martin Ingold und seiner Frau Anna-Maria Ingold, geb. Schmitz.

Verheiratet seit März 1979 mit Aiko Tanaka-Ingold, geb. Tanaka. Geburt der Tochter Mariko Nadine am 24. Juni 1984.

| | |
|---|---|
| 1962 - 1966 | Besuch der Grundschule in Wolfenweiler |
| 1966 - 1974 | Besuch des Rotteck-Gymnasiums (mathematisch-naturwissenschaftlich) in Freiburg |
| 30.05.1974 | Abitur |
| Oktober 1974 - Dezember 1975 | Ableistung des Grundwehrdienstes |
| 1976 - 1982 | Studium der Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 28.02.1978 | Diplomvorprüfung in Biologie |
| 1981 - 1982 | Anfertigung einer Diplomarbeit über das Thema "Isolierung und Charakterisierung von Glucansynthetase-Aktivitäten in Membranvesikeln aus pflanzlichen Zellkulturen (Daucus carota L.)" am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz. |
| 28.06.1982 | Diplom |
| 1982 - 1985 | Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Lehrstuhl für Allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.U. Seitz.<br>Die Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sachmittel). |
| 1980 - 1985 | Wissenschaftliche Hilfskraft |
| September 1982 - März 1985 | Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes (Promotionsstipendium) |

Meine akademischen Lehrer waren:

Apfelbach, Bardele, Bayer, Bentrup, Bessler, Braun, Bunke, Engelmann, Engels, Erkert, Frank, Grell, Guglielmi, Hager, Harder, Klee, Kulzer, Meyer-Brook, Meyer, Netzel, Oberwinkler, Pfeiffer, Rähle, Rieker, Rossbach, Sander, Schwemmle, Seiler, Seitz, H.U., Seitz, U., Seyffert, Strähle, Tichy, Wenk, Winkelmann, Zähner

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45